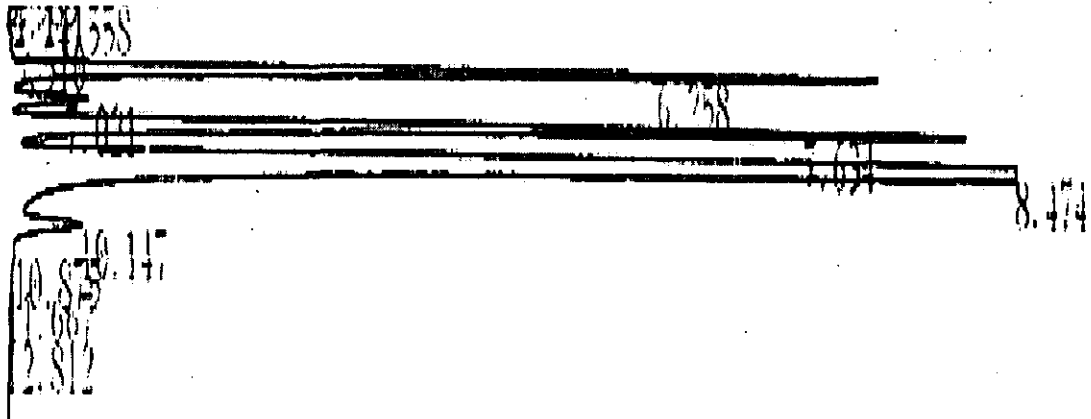


図5. イソニコチンアミド、ニコチンアミド、2-Py、4-Pyの各標準混合液のHPLCクロマトグラムの例



C-ESA CHROMATOPAC CH-1 Report No.=J DATA=I:CHRMI.C03 03/11/19 17:06:30

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	3.583	1348	64	V		0.0511	
	4	4.171	6811	542	V		0.2584	
	5	4.558	31811	2909	V		1.2069	
	6	5.51	2366	130	V		0.0898	
	7	6.258	336520	26990	V		12.768	
	8	7.021	35225	2487	V		1.3365	
	9	7.634	139691	29656	V		16.6824	
	10	8.474	1745755	84745	SV		66.2362	
	11	10.147	36124	1947	T		1.3706	
TOTAL			2635650	149470			100	

図6. 尿 (ラット) を試料とした HPLC クロマトグラム の例.

6.258 分が内部標準のイソニコチンアミド.

7.031 分がニコチンアミド

7.634 分が 2-Py.

8.474 分が 4-Py.

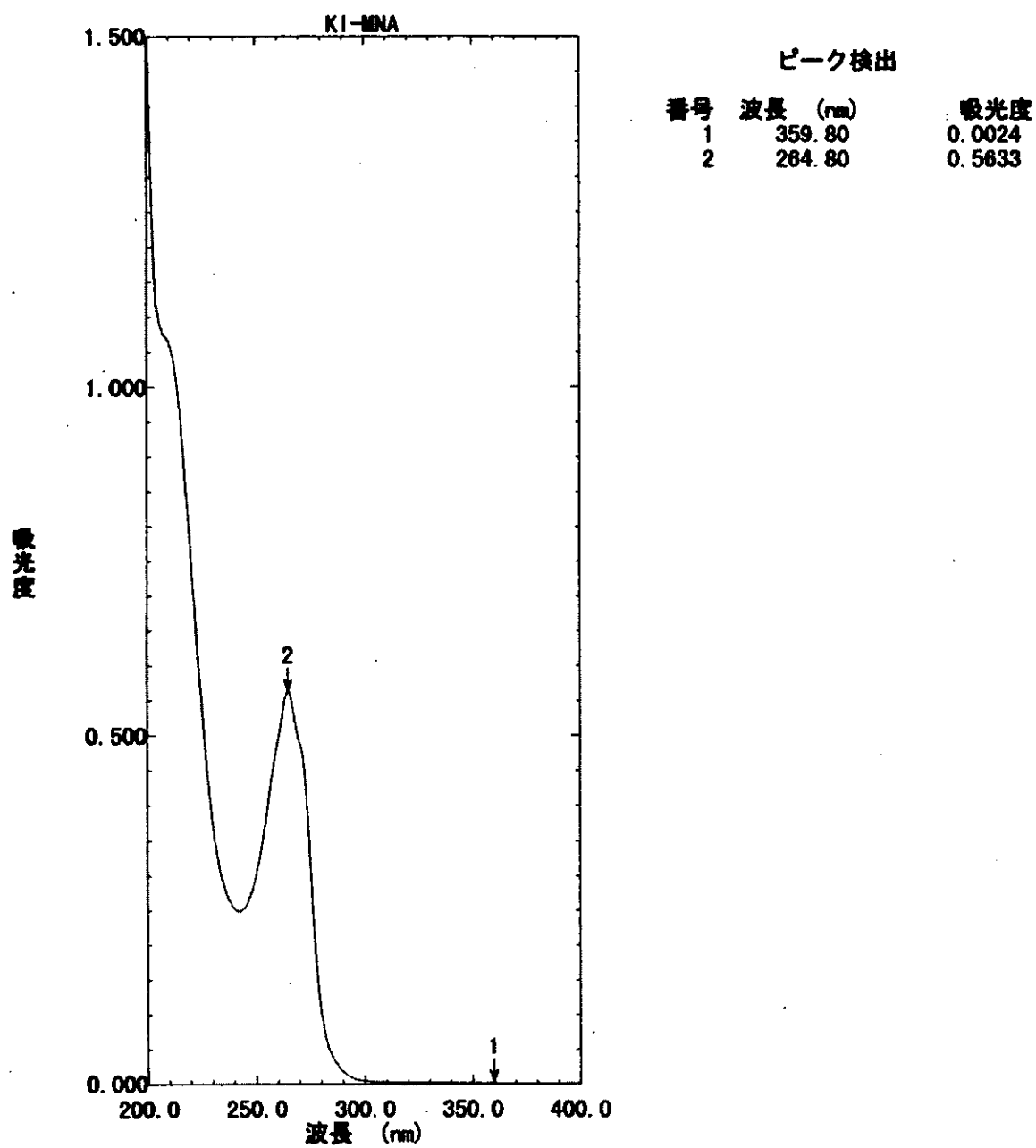


図7. MNAのUVスペクトラム

MNA 用ねじ口試験管使用

- ・尿——尿 100 μ l + 水 100 μ l = total 800 μ l
- ・標準——1) 20 μ g / ml MNA 標準溶液 20 μ l + 水 780 μ l = total 800 μ l

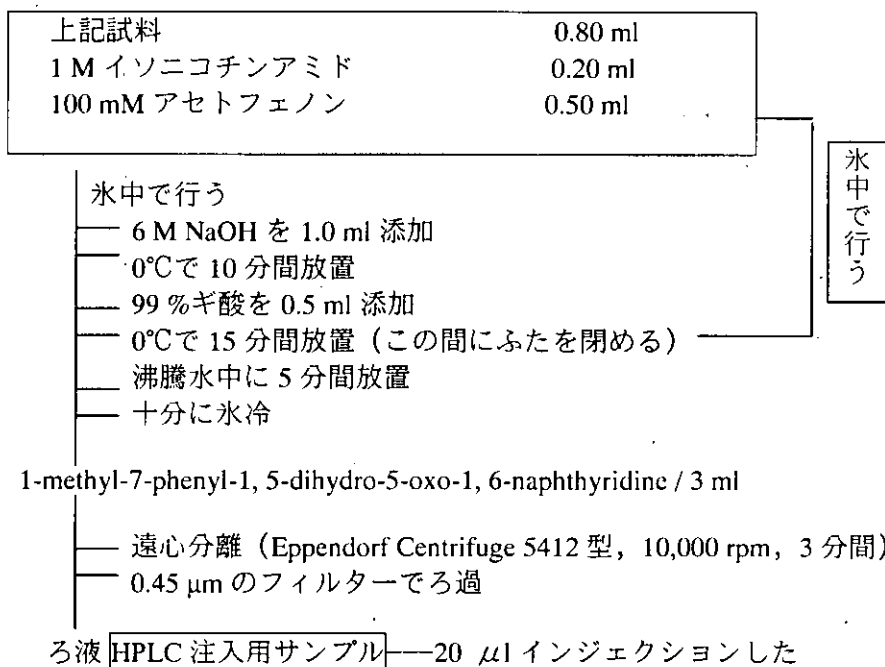


図 8. 尿を用いた時の MNA 定量のための試料作成の方法

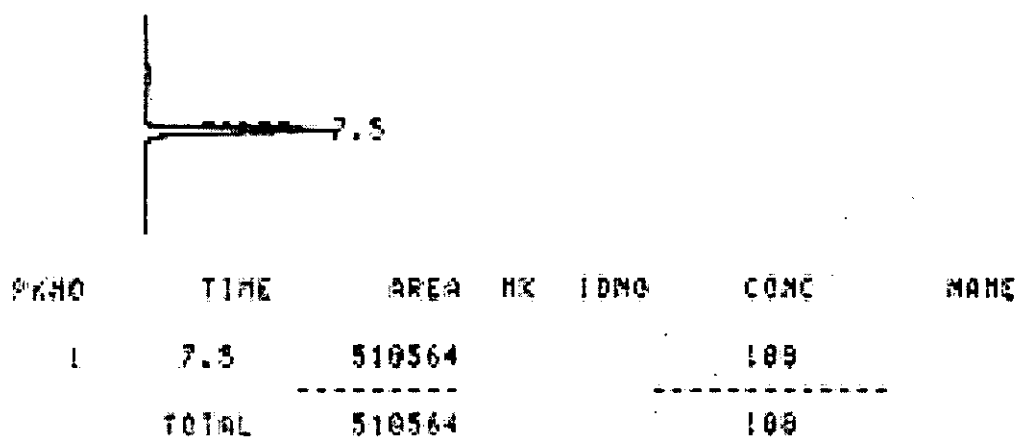
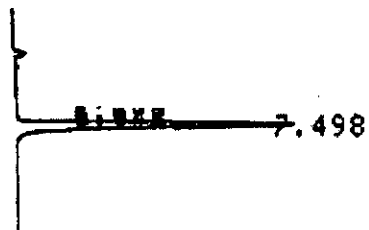


図 9. 標準の MNA を誘導体化した化合物の HPLC クロマトグラム の例



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.857	31687	Y		4.014	
2	7.498	757722	Y		95.986	
TOTAL		789409			100	

図 10. 尿を試料とした時の HPLC クロマトグラムの例 (MNA の測定)

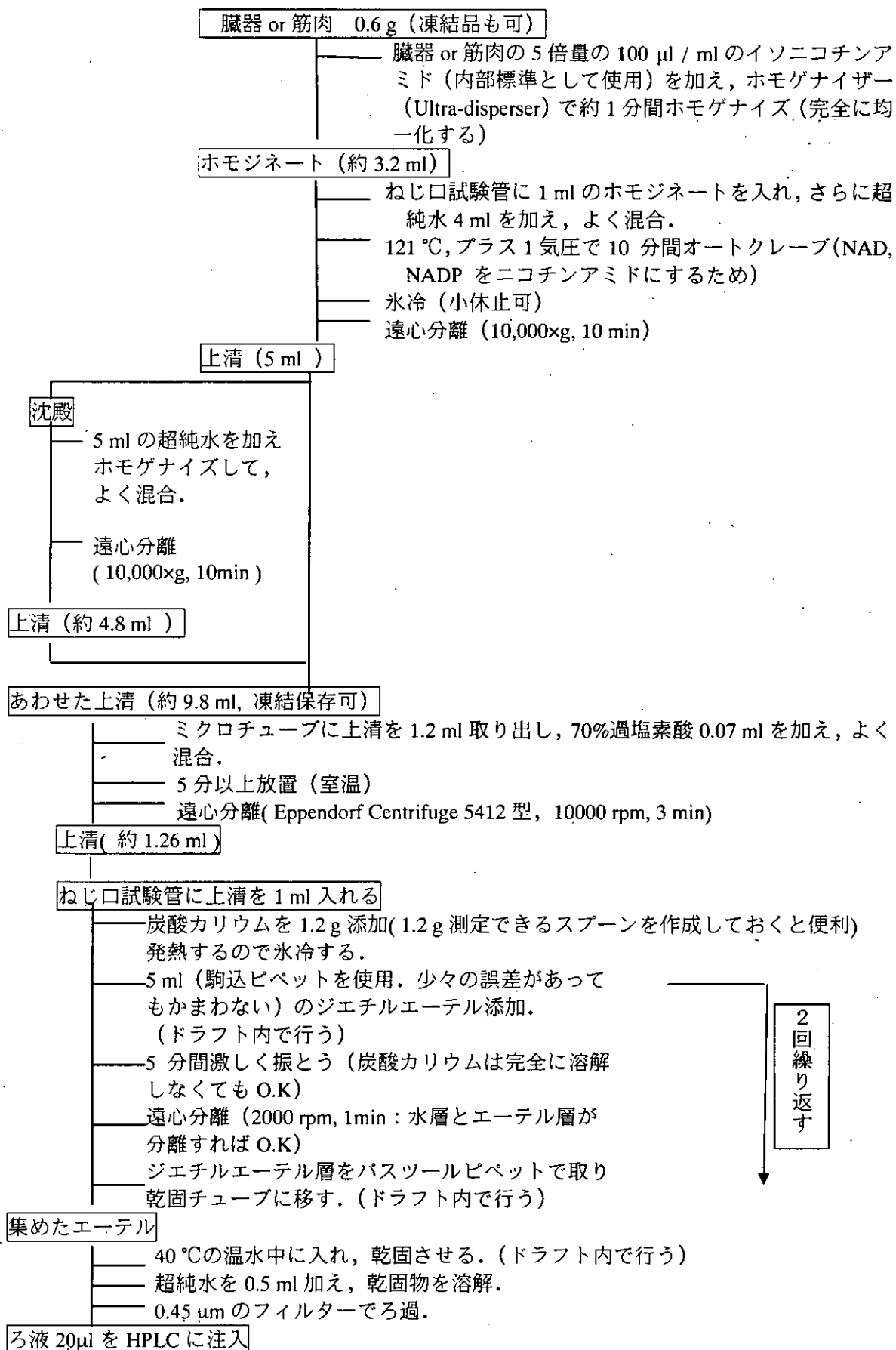


図 11. 生体試料を用いた時のニコチンアミド測定のための HPLC 注入試料の作成方法

内部標準：イソニコチンアミド

ニコチンアミド

5.643

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC
1	3	3.512	4192	262	V		1.4468
	5	4.217	1247	133	V		0.4305
	9	5.643	<u>259811</u>	31694	V		89.666
	10	6.307	<u>15293</u>	1549	V		5.2778
	11	6.792	1231	168	V		0.4249
TOTAL			289754	263			100

図 12. 鯉筋肉を試料としたときの HPLC クロマトグラム の例
5.643 分が内部標準のイソニコチンアミド。
6.307 分がニコチンアミド。

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

6. パントテン酸の定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したパントテン酸の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1. 微生物定量法による尿中パントテン酸排泄量測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.5M KPB (pH7.0)

1) 0.5 M KH_2PO_4

$\text{KH}_2\text{PO}_4=136.09$ (和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.5 \times 136.09 \times 500/1000 = 34.609 \text{ g}$

34.6g 秤量し, 超純水を加え溶解させ, 500ml 定容。

2) 0.5 M K_2HPO_4

$\text{K}_2\text{HPO}_4=174.18$ (和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.5 \times 174.18 \times 500/1000 = 43.545 \text{ g}$

43.5g 秤量し, 超純水を加え溶解させ, 500 定容。

3) 1)に 2)を加え pH7.0 に調製。

0.9%滅菌 NaCl

$\text{NaCl}=98.08$ (和光純薬株式会社, 室温保存)

1) 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。

パントテン酸標準液 (1nmol/ml)

※当日調製

パントテン酸カルシウム* = 476.54

(和光純薬株式会社, 冷蔵保存)

1) 0.04765 g (約 0.047 g) 秤量し, 超純水 1ml を溶解させる。→0.1 mM

2) 1) 10 μl に対し 超純水 990 μl 加えよく攪拌する。(100 倍希釈) →1 μM

3) 2) 10 μl に対し 超純水 990 μl 加えよく攪拌する。(100 倍希釈)

→10 nM PaACa soln. (=20 nM PaA soln)

4) 3) 80 μl に対し超純水 1520 μl 加えよく攪拌する。(20 倍希釈) →1 nM

*パントテン酸カルシウム 1 モルを水に溶解させるとパントテン酸 2 モル溶液になることに注意。〔D-パントテン酸 (MW 219.24)〕

保存用培地, 斜面培地

一般乳酸菌用培地 (日本製薬株式会社, 室温保存)。その組成を表 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 定容。

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)。

液体培地

一般乳酸菌用培地

(日本製薬株式会社, 室温保存)

1) 培地 3.6g 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) 微生物定量用試験管 (12×100mm) に 5ml ずつ分注し, アルミキャップをして, 5 分間, 121°C, プラス 1 気圧でオートクレーブにかけた後, 氷冷する。冷蔵保存。

パントテン酸定量用培地

パントテン酸定量用培地 (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 7.7g を秤量し、水を加え、沸騰水浴中で完全溶解後、100ml 定容。

1-2. 試料作成方法

ヒト (通常食) 尿 50~25 μ l

ラット (20%カゼイン食:通常食) 尿 25 μ l

1-3. 定量操作方法

①接種用菌の作成方法

- 1) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 の植えてある保存用培地から菌体を白金耳で取り、斜面培地に菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離 (3000rpm, 10 分間) し、沈殿部分の菌体を得る。
- 1) 菌体に 0.9%滅菌 NaCl, 5ml に懸濁し、遠心分離 (3000rpm, 5 分間) 後、再び 0.9%滅菌 NaCl, 5ml で洗浄する。この操作を計 3 回行う。
- 2) 最終的に集めた菌体を 0.9%滅菌 NaCl, 5ml に懸濁させる。さらにその懸濁液 50 μ l を 0.9%滅菌 NaCl, 5ml に懸濁させる。これを接種用菌とする。

②定量操作

- 1) 表 3 の溶液を定量用試験管 (12x75mm) に分注する。検量線用、試料共に 3 連で行うが、No.0 は 1 本のみで、菌を接種しないこと。(雑菌の繁殖がないことを確認するため)
- 2) 分注した試験管にキャップをし、オートクレーブ (5 分間, 121°C, プラス 1 気圧) 後、水冷する。
- 3) 調整した接種用菌を 50 μ l ずつ分注する (無菌操作)。
- 4) 30°C, 18~24 時間培養する。
- 5) 分光光度計を 660nm の波長にし、No.0 の欠菌の試験管で 0 合わせを行う。
- 6) 全ての試験管の吸光度を測定する。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、未知試料中の葉酸濃度を算出する。

1-4. 計算方法

検量線 (図 1) から標準の方程式を求める ($y = ax + b$)。

一日の尿中パントテン酸排泄量 (nmol/day) = $[(\text{試験溶液の吸光度} - b) / a] / \text{試験溶液中の尿量 (ml)} \times \text{希釈倍数} \times \text{1 日尿量 (ml)}$

(例)

1. ラット尿 (20%カゼイン食=通常食)
吸光度=0.280, $y=2.356x+0.057$, 尿量=25ml

$[(0.280-0.057)/2.356] / 0.025 \times 100 \times 25/1000=9.5 \mu\text{mol/day}$

1) ヒト尿 (通常食)

吸光度=0.108, $y=2.339x+0.013$, 尿量=825ml

$[(0.108-0.013)/2.339/0.025 \times 10 \times 825/1000 = 13.45 \mu\text{mol/day}$

2. 微生物定量法による生体試料及び食品中パントテン酸量測定方法

2-1. 試薬作成方法

50 m MKPB buffer (pH7.0)

1) 50 m M KH_2PO_4

$\text{KH}_2\text{PO}_4=136.09$ (和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.05 \times 136.09 \times 500/1000 = 3.402 \text{ g}$

3.40g 秤量し、超純水を加え溶解させ、500ml 定容。

2) 50mM K_2HPO_4

$\text{K}_2\text{HPO}_4=174.18$ (和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.05 \times 174.18 \times 500/1000 = 4.354 \text{ g}$

4.35g 秤量し、超純水を加え溶解させ、500ml 定容。

3) 1) に 2) を加え pH7.0 に調製。

0.5 M Tris-HCl (pH 8.3)

2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1, 3-プロパンジオール=121.14

$0.5 \times 121.14 \times 200/1000 = 12.114$

Tris を 12.114 g 測り取り約 100 ml の超純水に溶かし、HCl にて pH 8.3 に調整後、超純水で 200 ml 定容。

50 % glycerol

グリセリン (Glycerol) =92.09 assay : 99.0% (和光純薬株式会社, 室温保存)

glycerol 20 g 秤量し、超純水 20 ml を加え混合。

0.02 M KHCO_3

炭酸水素カリウム=100.12

(和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.02 \times 100.12 \times 100/1000 = 0.2002$

KHCO_3 を 0.20 g 秤量し、超純水加え溶解後、超純水で 100 ml 定容。

15 μ g/ml 還元グルタチオン (Tris soln.)

グルタチオン (還元) =307.33

1) グルタチオンを 0.015 g 秤量し 1 ml の Tris-buffer (pH8.3) に溶解 \rightarrow 15mg/ml

2) さらに 100 倍希釈: 10 μ l, Tris-HCl (pH 8.3) 990 μ l \rightarrow 150 μ g/ml

3) さらに 10 倍希釈: 100 μ l, 0.5 M Tris-HCl

(pH 8.3) 900 μ l \rightarrow 15 μ g/ml

腸ホスファターゼ

(Phosphatase, Alkaline from calf intestine, SIGMA P7923, 2000 units, 冷蔵)

- 1) 50 % glycerol, 1 ml を試薬容器に直接入れ静かに攪拌。(激しくすると泡立つ)
 \rightarrow 2000 U/ml
- 2) さらに 10 倍希釈: 酵素 10 μ l, 50 % glycerol 90 μ l \rightarrow 200 U/ml
- 3) さらに 20 倍希釈: 酵素 20 μ l, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3) 380 μ l
 \rightarrow 10 U/ml

ハト肝アミダーゼ

Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376, 10 g, -20 $^{\circ}$ C 蔵

作成方法を図 2 に示す。

0.5MKPB buffer (pH7.0), 0.9%滅菌 NaCl, パントテン酸標準液, 保存培地, 斜面培地, 液体培地, 定量培地は 1-1.試薬作成方法と同様。

2-2. 試料作成方法

図 3 に生体試料及び食品からの総パントテン酸の抽出法を, 図 4 に結合型パントテン酸の加水分解法を示した。

2-3. 定量操作方法

1-3.と同様。

2-4. 計算方法

検量線から標準の方程式を求める。(y=ax+b)

パントテン酸排泄量 (nmol/day)

= [(試験溶液の吸光度-b) / a] / 試験溶液中の試料量 (ml) \times 4.5(ml)/0.1 (ml) \times 10(ml)

4.5ml = 加水分解で得られた試料量,

0.1ml = 加水分解に用いた試料抽出液量,

10ml = 試料抽出時に加えた buffer 量

(例)

1.ラット (20%カゼイン食:通常食) 肝臓中パントテン酸量

$[(0.131 + 0.033) / 3.363] / 0.1 \times 4.5 / 0.1 \times 10 =$
220.5nmol/g of liver

※吸光度=0.131, y=3.363x-0.033,

2.ラット (20%カゼイン食:通常食) 血液中パントテン酸量

$[(0.069 + 0.033) / 3.363] / 0.3 \times 4.5 / 0.1^{*1} \times 1$
 $/ 0.1^{*2} = 45 \text{ nmol / ml of blood}$

※吸光度=0.069, y=3.363x-0.033,

4.5ml = 加水分解で得られた試料量,

*¹ 0.1ml = 加水分解に用いた試料抽出液量,

*² 0.1ml = 抽出処理に用いた血液量

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

表1. 一般乳酸菌培地の組成

試薬	重量 (g)
酵母エキス	5.5
ペプトン	12.5
ブドウ糖	11.0
リン酸二水素カリウム	0.25
リン酸一水素カリウム	0.25
酢酸ナトリウム	10.0
硫酸ナトリウム	0.1
硫酸マンガン	0.005
硫化第一鉄	0.005

表2. パントテン酸定量用培地の組成

試薬	重量 (g)
カザミノ酸	14
L-システイン	0.4
DL-トリプトファン	0.2
硫酸アデニン	0.02
塩酸グアニン	0.02
ウラシル	0.01
塩酸チアミン	0.0002
リボフラビン	0.0004
p-アミノ安息香酸	0.0002
ビオチン	0.0000008
ニコチン酸	0.001
塩酸ピリドキシン	0.0008
リン酸二水素カリウム	1
リン酸一水素カリウム	1
硫酸マグネシウム	0.4
硫化第一鉄	0.02
硫酸マンガン	0.02
酢酸ナトリウム (無水)	20
ぶどう糖	40

表3. パントテン酸の定量操作方法 (全容量、2ml)

No.	PaA final conc (nmol/tube)	1nmol/ml PaA(μl)	H ₂ O (μl)	Buffer (μl)	Medium (ml)	Total (ml)
0	0.000	0	800	200	1	2
1	0.010	10	790	↓	↓	↓
2	0.025	25	775			
3	0.050	50	750			
4	0.075	75	725			
5	0.100	100	700			
6	0.150	150	650			
Sample	x	(*)	800-*			

* 5~25μl

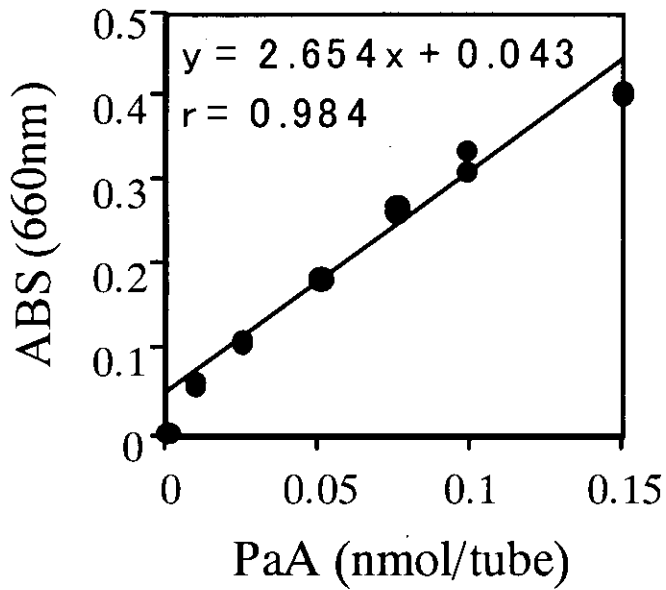


図1. パントテン酸の検量線の一例

Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376, 10 g, 38,500 円, -20 °C 保存

Acetone powder 0.5 g を秤量瓶に入れ、回転子を入れ氷冷

↓←10 倍量の 0.02 M KHCO₃ を入れる (5 ml)

静かに攪拌 (激しくすると泡立つ)

↓ 冷却遠心分離 15,000 rpm, 5 min, 4°C

上清

↓←Dowex 1x8 (Cl⁻) ※ を添加 (1:1 vol/vol)

↓ 冷却遠心分離 15,000 rpm, 5 min, 4°C

アミダーゼ溶液 *小分けし冷凍保存 (-20 °C)

※イオン交換樹脂活性化方法

1) 1N HCl 溶液

HCl (11.6M) (和光純薬)を超純水で 12 倍希釈する。

2) 1N KOH 溶液

KOH (M.w 56.11) (和光純薬) 5.611g を超純水 80ml に溶かし, 超純水で 100ml 定容。

3) Dowex 1x8 (Cl⁻)調製方法

Dowex 1x8 (Cl⁻) (ムロマチテクノス株式会社) 10g

↓←1N HCl 100ml (Dowex の 10 倍量)

攪拌 10min

↓

ろ過 (超純水で洗いながら)

↓← 1N KOH 100ml (Dowex の 10 倍量)

攪拌 10 min

↓

ろ過 (超純水で洗いながら)

↓← 1N HCl 100ml (Dowex の 10 倍量)

攪拌 10min

↓

ろ過 (超純水で十分に洗う)

↓←0.5 M Tris-HCl (pH 8.3)で pH 8.0 に調整

懸濁液 (冷蔵保存, 2 日以内に使用) 使用時にろ過し, 沈殿を用いる。

図 2. アミダーゼの調製方法

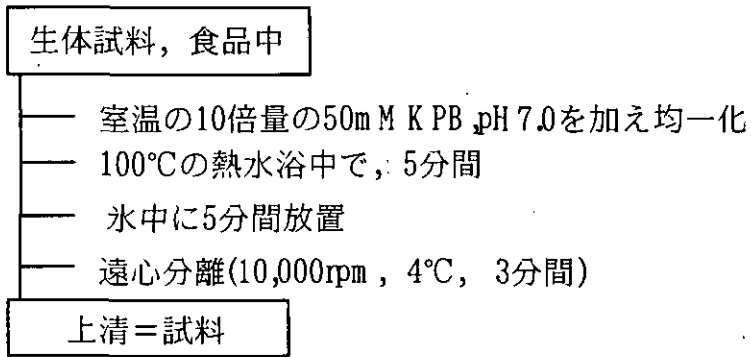


図3. 食品中からの総パントテン酸の抽出方法

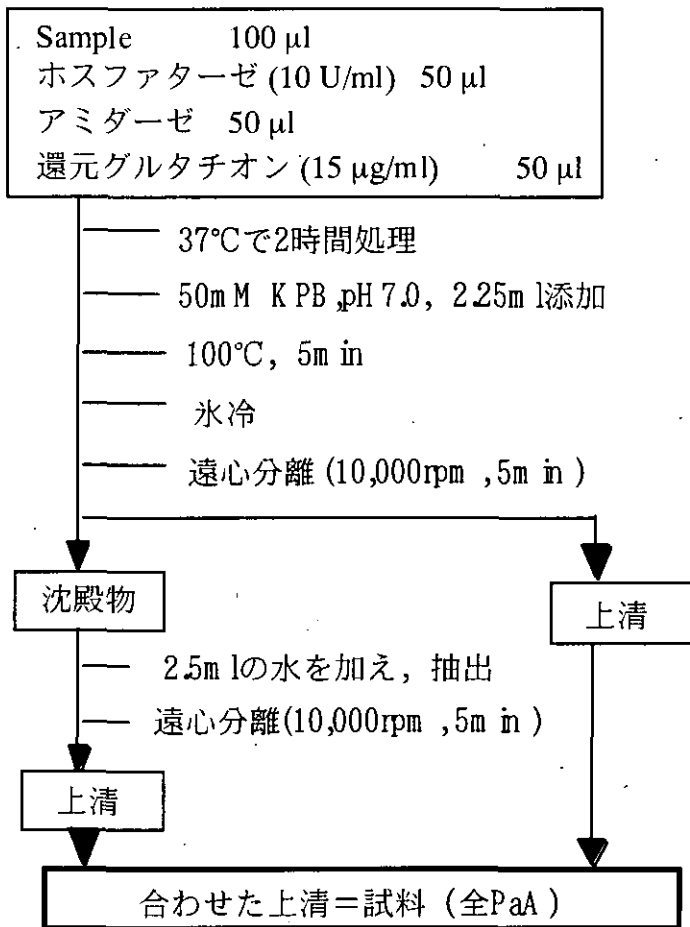


図4. 結合型パントテン酸の加水分解方法

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

7. 葉酸

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用した葉酸の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1. 微生物定量方法による尿中葉酸測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.1Mリン酸緩衝液(pH6.1)

$\text{KH}_2\text{PO}_4=136.09$, $\text{NaOH}=40.00$, L(+)-アスコ
ルビン酸=176.13

(全て和光純薬工業株式会社, 室温保存)

KH_2PO_4 13.61g, NaOH 1.89g, L(+)-アスコ
ルビン酸5gを水1000mlに加えてpH6.1に調製する。
※約5日間冷蔵保存可能

0.9%滅菌NaCl

$\text{NaCl}=98.08$

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

- 1) NaClを4.5g秤量し超純水で500mlにメスア
ップする。
- 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。

葉酸標準液

①葉酸標準原液(0.2mg/ml)

葉酸(Folic Acid) = 441.40 (和光純薬工業
株式会社, 遮光冷蔵保存)

- 1) 葉酸0.005gを秤量し, 0.1N NaOH 0.5mlを加
え, 溶解し, 水で25mlにメスアップする。
※遮光冷蔵下で1ヶ月保存可
- 2) 吸光度を測定する。対照セルには水を入れ
る。OD₂₈₂=27,600から正確な濃度を計算する。
このスペクトルを図1に示した。

※0.1N NaOH

$\text{NaOH}=40.00$ (和光純薬工業株式会社)

NaOHを0.4g秤量し, 超純水を加え溶解し,

100mlにメスアップする。

②葉酸標準液(1ng/ml) ※当日調製

葉酸標準原液(0.2mg/ml)を水で希釈し,
10ng/mlに調整する。

- 1) 標準原液50μlに対し超純水950μl(20倍希釈)
→10μg/ml
- 2) 1)10μlに対し超純水990μl(100倍希釈)→
100ng/ml
- 3) 2)500μlに対し超純水4500μl(10倍希釈)→
10ng/ml

保存用培地, 液体用培地

「Brain Heart infusion Broth」

(日本製薬株式会社, 室温保存)を使用。組成
を表1に示した。

寒天(Agar, Powder)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

- 1) 培地を3.5g, 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)。

液体培地

「Brain Heart infusion Broth」

(日本製薬株式会社, 室温保存)を使用。組成
を表1に示した。

- 1) 培地3.5g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) 微生物定量用試験管(12×100mm)に5ml

ずつ分注し、アルミキャップをして、5分間、121°C、プラス1気圧でオートクレーブにかけた後、氷冷する。冷蔵保存。

葉酸定量用培地

葉酸定量用培地

(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11.4gを秤量し、水を加え、沸騰水浴中で完全溶解後、100mlにメスアップする。

1-2. 試料調製方法

- ・ビタミン摂取無しの尿 100 μ l
- ・ビタミン摂取(所要量の3~6倍量) 有りの尿 50~200 μ l

1-3. 定量操作方法

① 接種用菌の作成方法

- 1) *Streptococcus faecalis R*, (*Enterococcus hirae*) の植えてある保存用培地から菌体を白金耳で取り、斜面培地に塗布する。30°Cで24時間培養する。
- 2) 培養した斜面培地から菌体を白金耳で取り、新しい斜面培地に塗布する。30°Cで24時間培養する。
- 3) 作成した液体培地に斜面培地から菌体を白金耳で取り、30°C、18~24時間培養する。
- 4) 液体培地に培養してある菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離(3000rpm, 10分間)し、沈殿部分の菌体を得る。
- 5) 菌体に0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁し、遠心分離(3000rpm, 5-7分間)後、再び0.9%滅菌NaCl, 5mlで洗浄する。この操作を計3回行う。
- 6) 最終的に集めた菌体を0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁させる。さらにその懸濁液50 μ lを0.9%滅菌NaCl 5mlに懸濁させる。これを接種用菌とする。

② 定量操作

- 1) 表3の溶液を定量用試験管(12 \times 75mm)に分注する。検量線用、試料共に3連で行うが、No.0は1本のみで、菌を接種しないこと。(雑菌の繁殖がないことを確認するため)
- 2) 分注した試験管にキャップをし、オートクレーブ(5分間、121°C、プラス1気圧)後、氷冷する。
- 3) 調整した接種用菌を50 μ lずつ分注する(無菌

操作)。

- 4) 30°C、18~24時間培養する。
- 5) 分光光度計を660nmの波長にし、No.0の欠菌の試験管で0合わせを行う。
- 6) 全ての試験管の吸光度を測定する。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、未知試料中の葉酸濃度を算出する。標準の検量線の一例を図2に示した。

1-4. 計算方法

検量線から標準の方程式を求める。(y=ax+b)
一日の尿中葉酸排泄量 (μ g/day)
= [(試験溶液の吸光度-b) / a] / 試験溶液中の尿量 (ml) \times 希釈倍数 \times 一日尿量 (ml) \times 1/1000

(例) ヒト(通常食)尿

[(0.079 - 0.024) / 0.218] / 0.1 \times 825 \times 1/1000 = 2.079 μ g/day

0.079 = 吸光度, y=0.218x+0.024, 825 = 全尿量

2. 微生物定量法による食品中の葉酸測定方法

2-1. 試薬作成方法

プロテアーゼ溶液 (200U/ml) ※当日調製
プロテナーゼMS (20,000U/0.5g包) (科研製薬、室温保存)
プロテアーゼ0.5g包を水200mlに加え、溶解させる。

コンジュガーゼ溶液

① 1N HCl溶液

Hydrochloric Acid = 36.46

(和光純薬工業株式会社、室温保存)

Assay 35.0~37.0%, 比重 1.18]

1180 \times 36 / 100 = 424.8 (g) \cdots 1Lに含まれる塩酸量

424.8 / 36.5 = 11.6 mol / L \cdots 1Lに含まれる塩酸のモル濃度

HClを1ml取り、超純水を115ml加えてよく混和した。

② 1N NaOH溶液

NaOH=40.0

(和光純薬工業株式会社、常温保存)

NaOHを4gを秤量し、超純水を加え溶解させ、100mlにメスアップした。

③ イオン交換樹脂 (Dowex 1X8) ※当日調

製

- 1) Dowex 1X8 (ムロマテテクノス株式会社)
Dowex 1X8 を10g秤量し 1N HCl 100ml (Dowexの10倍量)で10分間攪拌し、十分に水で洗いながら、濾紙を用いて濾過する。
- 2) 1N NaOH 100ml (Dowexの10倍量)で再度10分間攪拌し、1N HClで洗いながら濾過する。
- 3) pH試験紙で確認しながら、水で中性を示すまで洗う。

④ 0.02Mシステイン塩酸塩溶液 (pH5.58)

L-システイン塩酸塩一水和物= 175.64
(和光純薬株式会社, 室温保存)
L-システイン塩酸塩一水和物0.351gを秤量し、超純水を加え、1N NaOHでpH5.58に調製した後、超純水で100mlにメスアップする。

⑤ コンジュガーゼ溶液の調製方法

図3にコンジュガーゼ溶液の調製方法を示した。

定量用培地

Folic Acid Casei Medium (Sigma, 冷蔵保存)
その組成を表4に示した。
培地を11.4gを秤量し、水を加え、沸騰水浴中で完全溶解後、100ml定容。

保存用培地, 斜面培地

一般乳酸菌用培地

(日本製薬株式会社, 室温保存)。その組成を表5に示した。

寒天 (Agar, Powder)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

- 1) 培地を3.96g, 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)。

液体培地

一般乳酸菌用培地

(日本製薬株式会社, 室温保存)

- 1) 培地3.96g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) 微生物定量用試験管 (12×100mm) に5mlずつ分注し、アルミキャップをして、5分間、121°C, プラス1気圧でオートクレーブにかけた後、氷冷する。冷蔵保存。

2-2. 試料調製方法

試料作成方法を図4に示した。

2-3. 定量操作方法

① 接種用菌の作成方法

- 1) *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei*), ATCC 2773の植えてある保存用培地から菌体を白金耳で取り、斜面培地に菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離 (3000rpm, 10分間) し、沈殿部分の菌体を得る。
- 2) 菌体に0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁し、遠心分離 (3000rpm, 5-7分間) 後、再び0.9%滅菌NaCl, 5mlで洗浄する。この操作を計3回行う。
- 3) 最終的に集めた菌体を0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁させる。さらにその懸濁液50 μ lを0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁させる。これを接種用菌とする。

② 定量操作

- 1) 表6の溶液を定量用試験管 (12×75mm) に分注する。検量線用, 試料共に3連で行うが, No.0は1本のみで, 菌を接種しないこと。(雑菌の繁殖がないことを確認するため)
- 2) 分注した試験管にキャップをし, オートクレーブ (5分間, 121°C, プラス1気圧) 後, 氷冷する。
- 3) 調整した接種用菌を50 μ lずつ分注する (無菌操作)。
- 4) 37°C, 22~24時間培養する。
- 5) 分光光度計を660nmの波長にし, No.0の欠菌の試験管で0合わせを行う。
- 6) 全ての試験管の吸光度を測定する。標準溶液の吸光度から検量線を作成し, 未知試料中の葉酸濃度を算出する。
検量線の一例を図5に示した。

2-4. 計算方法

検量線から標準の方程式を求める。(y=ax+b)
各食事の葉酸含量 (μ g/day)

$$= [(\text{試料溶液の吸光度} - b) / a] / \text{試料溶液量 (ml)}$$

$$\times 50 \text{ml} \times \text{試料重量 (ml)} \times 1/1000$$

※50ml：試料作成時の定容量

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

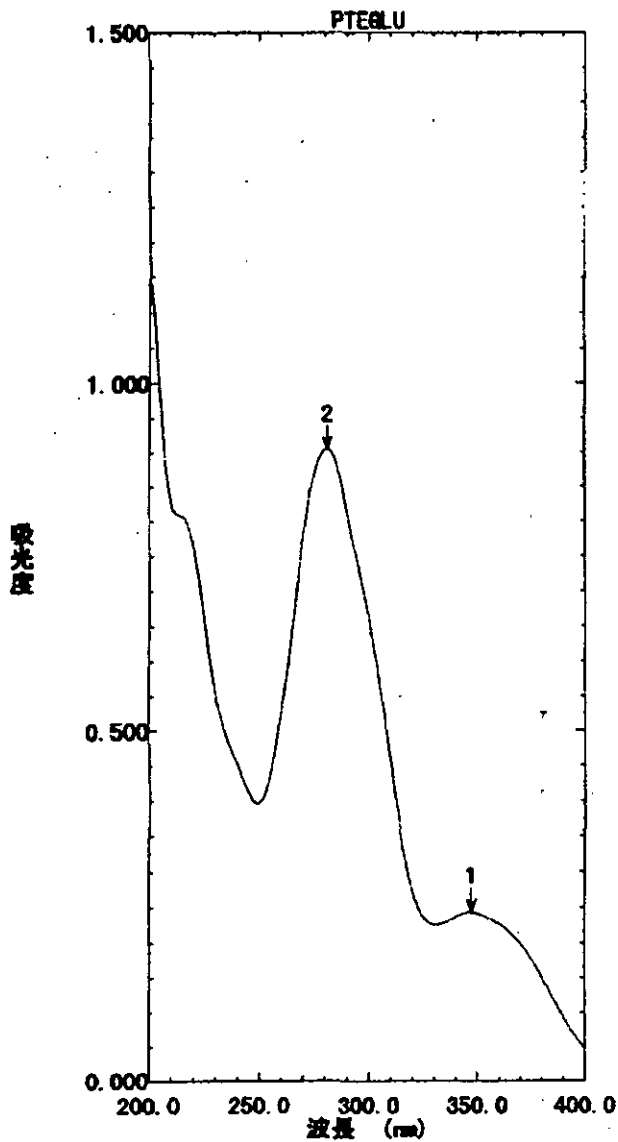
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



ピーク検出

番号	波長 (nm)	吸光度
1	347.80	0.2422
2	281.00	0.9044

$$\epsilon_{282} = 27600$$

$$0.9044 / 27600 = 3.28 \times 10^{-5} \text{M}$$

原液を 15 倍希釈したので

$$3.28 \times 10^{-5} \times 15$$

$$= 49.2 \times 10^{-5} \text{M}$$

PteGlu 分子量 441.40 より

$$49.2 \times 10^{-5} \times 441.40$$

$$= 0.217$$

$$\approx 0.22 \text{ mg / ml}$$

図 1. 葉酸標準溶液の吸収スペクトルの一例

E.hirae

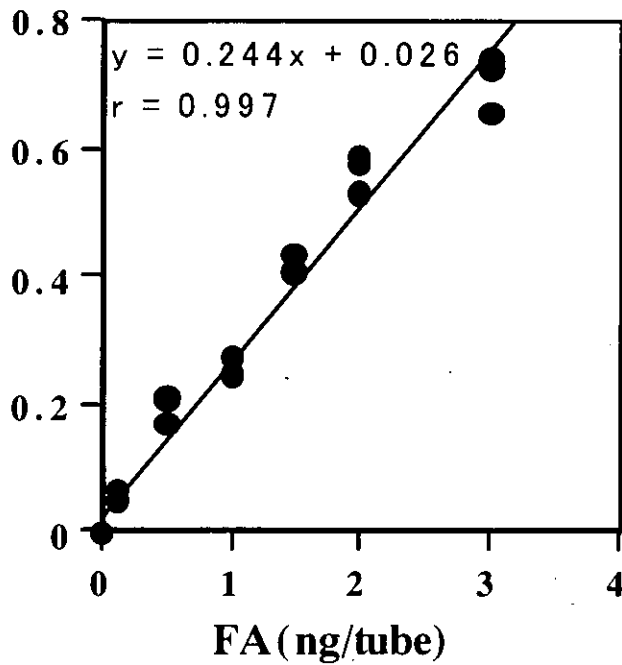


図2. 葉酸定量のための検量線の一例 (*E. hirae* を検定菌とした時)

コンジュガーゼ溶液調製方法

KEDNY ACETON POWDER (Sigma, Poricin, Type II, 冷凍保存)

0.02M システイン塩酸塩溶液 (pH5.58)

↓ 氷冷しながら攪拌 (1~2 時間)

↓ 冷却遠心分離 (10,000rpm, 4°C, 10 分間)

上清

↓ 冷却遠心分離 (10,000rpm, 4°C, 5 分間)

上清

↓← Dowex 1x8 (Cl) (10g/ 100m)

↓ 攪拌, 30 分間

↓ 冷却遠心分離 (10,000rpm, 4°C, 10 分間)

↓ 濾過

上清=コンジュガーゼ溶液 ※小分けして, -20°Cにて数年間保存可能

図3. コンジュガーゼ溶液の調製方法