

食品中処理法

試料 1~2g

0.1M リン酸緩衝液 (pH6.1)

↓

オートクレーブ (121°C, プラス 1 気圧, 5 分間)

↓

氷冷

↓←プロテアーゼ溶液 5ml

保温, 37°C, 2~3 時間

↓

加熱, 100°C, 10 分間

↓

氷冷

↓←コンジュガーゼ溶液 0.5ml

↓←システイン 12.5mg

保温, 37°C, 15~20 時間

↓

加熱, 100°C, 10 分間

↓

氷冷

↓ 冷却遠心分離 (12,000rpm, 4°C, 10 分間)

上清

↓

定容 50ml, 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.1)= 試料

図 4 . 食品中の葉酸測定のための試料作成方法

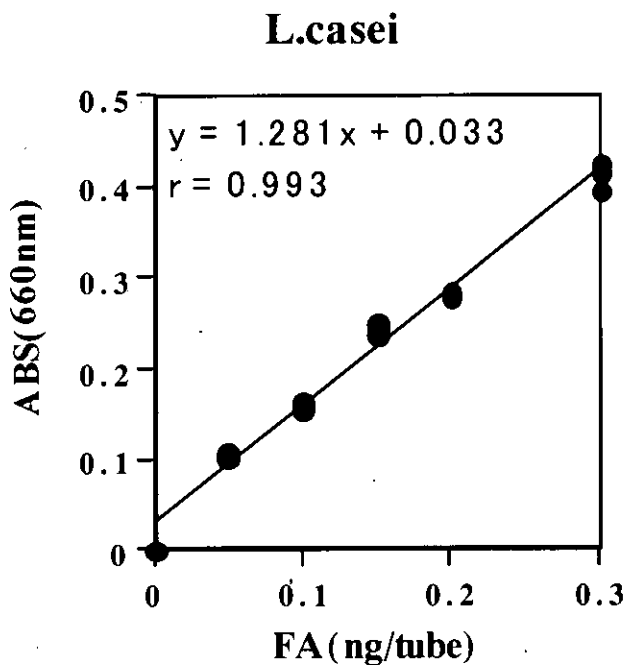


図 5 . 葉酸測定のための検量線の一例 (*L. casei* を検定菌とした時)

表 1. Brain heart infusion 培地

試薬	重量 (g)
牛脳エキス末	7.5
ハートエキス末	8.0
ペプトン	10.0
ぶどう糖	2.0
塩化ナトリウム	5.0
リン酸一水素カリウム	2.5

表 2. 葉酸定量用培地の組成 (1L分)

試薬	重量 (g)
カザミノ酸	10
L-システイン	0.76
L-トリプトファン	0.2
L-アスパラギン	0.6
硫酸アデニン	0.01
硫酸グアニン	0.01
ウラシル	0.01
キサントシン	0.02
グルタチオン	0.0052
塩酸チアミン	0.0004
リボフラビン	0.001
塩酸ピリドキシン	0.004
ニコチン酸	0.0008
パントテン酸カルシウム	0.0008
p-アミノ安息香ピオチン酸	0.001
ピオチン	0.00002
リン酸一水素カリウム	6.4
硫酸マグネシウム	0.4
硫化第一鉄	0.02
硫酸マンガン	0.22
クエン酸ナトリウム	62.0
ブドウ糖	40
ポリソルベート 80	0.1

表3. *Streptococcus faecalis R (Enterococcus hirae)*を使用する場合の標準, 試験溶液

No.	FA final conc (ng/tube)	10ng/ml FA (μ l)	H ₂ O (μ l)	0.1M リン酸 Buffer (μ l)	Medium (ml)	Total (ml)
0	0.00	0	800	200	1	2
1	0.10	10	790	↓	↓	↓
2	0.50	50	750			
3	1.00	100	700			
4	2.00	200	600			
5	3.00	300	500			
6	4.00	400	400			
7	5.00	500	300			
Sample	x	(*)	800 - *	↓	↓	↓

* : 尿 50~200 μ l

表4. Folic Acid Casei Medium の組成 (1 L分)

試薬	重量(g)
カゼイン	10
デキストロース	40
酢酸ナトリウム	40
リン酸二水素カリウム	1
リン酸一水素カリウム	1
L-アスパラギン	0.6
L-システイン-HCl	0.5
硫酸マグネシウム (無水)	0.2
DL-トリプトファン	0.2
ポリソルベート 80	0.1
キサンチン	0.02
塩化ナトリウム	0.02
硫酸第一鉄	0.02
硫酸マグネシウム	0.015
硫酸アデニン	0.01
グアニン-HCl	0.01
ウラシル	0.01
グルタチオン	0.005
塩酸ピリドキサール	0.004
p-アミノ安息香酸	0.002
リボフラビン	0.001
パントテン酸カルシウム	0.0008
チアミン塩酸塩	0.0004
ビオチン	0.0002

表5. 一般乳酸菌用培地組成

試薬	重量 (g)
酵母エキス	5.5
酢酸ナトリウム	10.0
ペプトン	12.5
硫酸マグネシウム	0.1
ブドウ糖	11.0
硫酸マンガン	0.005
リン酸二水素カリウム	0.00025
硫化第一鉄	0.005
リン酸一水素カリウム	0.00025

表6. *L.casei* を使用する場合の標準, 試験溶液

No.	FA final conc (ng/tube)	1ng/ml FA (μ l)	H ₂ O (μ l)	0.1M リン酸 Buffer (μ l)	Medium (ml)	Total (ml)
0	0.00	0	800	200	1	2
1	0.05	50	750	↓	↓	↓
2	0.10	100	700			
3	0.15	150	650			
4	0.20	200	600			
5	0.25	250	550			
6	0.30	300	500			
7	0.40	400	400			

Sample x (*) 800-*

* : 試料溶液 50~600 μ l

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

8. ビオチンの定量方法

研究要旨

本研究で使用したビオチン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ビオチン測定方法

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.

ビオチン標準原液 (冷凍保存)

(+) - Biotin = 244.31

(和光純薬工業株式会社, 2-10°C・遮光保存)

ビオチン 0.05 g を 50%エタノール溶液 50 ml に溶解し, これを原液 (1 mg/ml) とした.

ビオチン標準溶液 (冷凍保存)

ビオチン標準原液を超純水で希釈し,

1 ng/ml の濃度に調整する.

1) ビオチン標準原液 (1 mg/ml) 10 μ l に対し,

超純水 990 μ l (100 倍希釈) \rightarrow 10 μ g/ml

2) 1)10 μ l に対し超純水 990 μ l (100 倍希釈)

\rightarrow 100 ng/ml

3) 2)10 μ l に対し超純水 990 μ l (100 倍希釈)

\rightarrow 1 ng/ml

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 \times 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

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 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 3.6g 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 \times 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.

ビオチン定量用培地 ※当日作成

ビオチン定量用培地 (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, 超純水を加え, 沸騰水

浴中で完全溶解後、100ml 定容。

1-2. 試料作成方法

尿を遠心分離 (2000rpm, 5min 卓上本架遠心機 TOMY LC-122) し、必要に応じて超純水で希釈。

(例) ヒト尿→4 倍, ラット尿→原液

*10 μ l を試料として使用する。

1-3. 定量操作方法

①接種用菌の作成方法

- 1) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 の植えで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 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 0.05ml を 0.9% 滅菌 NaCl, 5ml に懸濁させる。これを接種用菌とする。

※長期間測定を行わない場合は液体培地中で培養した *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を「保存用平面寒天培地」に穿刺して接種し、37°C で 20 時間培養し、冷蔵庫で保存する (約 3 ヶ月保存可能、一ヶ月毎に継代するとよい)。

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) 37°C, 21 時間前後培養する。
- 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 1 に示した。

1-4. 計算方法

検量線より試料中のビオチン量 (ng / tube)

を求める。

尿中ビオチン量 (ng / day)

= ビオチン (ng / tube) / 10 μ l \times 10³ \times (全尿量 \cdot ml) \times 試料希釈倍数

10 μ l = 試験管に入れた尿量

10³ = 位を μ l から ml にした。

(例)

1. ヒト尿 (通常食)

[(0.358-0.048)/3.487] / 10 \times 10³ \times 914 \times 8 = 6500ng/day

※吸光度=0.358, y=3.487x+0.048, 全尿量 914ml, 希釈倍数=8

2. ラット (通常食: 20% カゼイン食) 尿

[(0.127 - 0.022) / 2.355] / 10 \times 10³ \times 25 = 111ng/day

※吸光度=0.127, y=2.355x+0.022, 全尿量 25ml

2. 微生物定量法による食品中のビオチン定量測定方法

2-1. 試薬作成法

2.25 M 硫酸

H₂SO₄ = 98.08 (和光純薬工業株式会社, 室温保存)

98.08 (mol / l) \times 2.25 (M) \times 10⁻³ \times 10(ml) = 2.2068

H₂SO₄ 2.207 g を秤量し、超純水で 10 ml 定容。

ビオチン標準液, 0.5MKPB buffer (pH7.0), 保存用培地, 斜面培地, 液体培地, 定量用培地, 0.5% 滅菌 NaCl は 1-1. 試薬作成方法と同様。

2-2. 試料作成方法

図 2 に食品中のビオチンを遊離させる方法を示した。

2-3. 定量操作方法

1-3. 定量操作方法と同様。

2-4. 計算方法

検量線より試料中のビオチン量 (ng / tube) を求める。

食事中ビオチン量 (ng) = ビオチン (ng/tube) \times 試料希釈倍数 \times A / B \times C / D

A : ミキサー後食事全重量(g)

B : 処理に使った液状食事全重量(g)

C : (液状食事 1g + 水 1ml + 2.25 M 硫酸 1ml) の合計重量(g)

D : (d) の比重から求めた試料重量(g) / 10 μ l

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

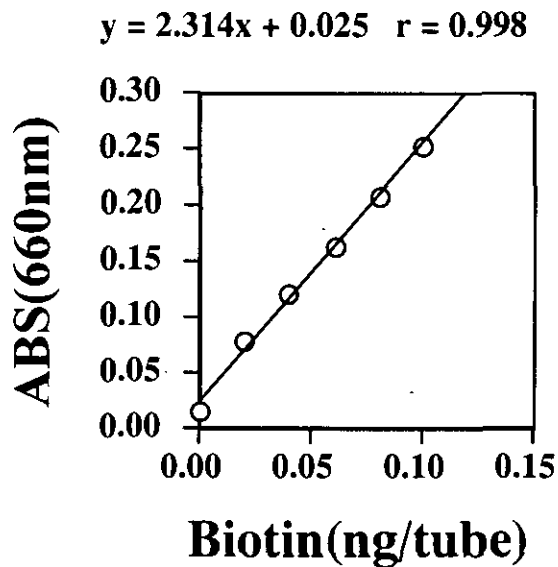


図1. ビオチン定量のための検量線の一例

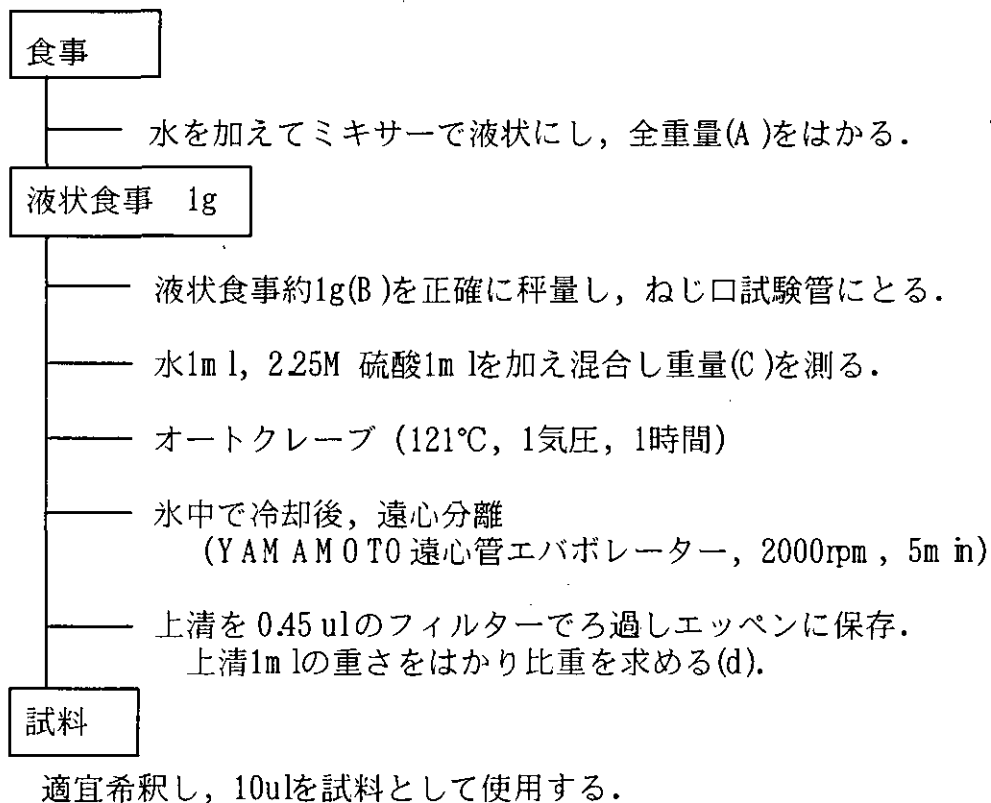


図2. 食品中の結合型ビオチンの遊離化操作方法

表1. 一般乳酸菌用培地の組成

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
硫酸マグネシウム	0.1
硫酸マンガン	0.1
硫酸第一鉄	0.005

表2. ビオチン定量用培地の組成 (1L分)

試薬	重量 (g)
カザミノ酸	14
L-シスチン	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	0.02
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
パントテン酸	0.0004
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
硫酸第一鉄	0.02
硫酸マンガン	0.02
酢酸ナトリウム (無水)	20
ブドウ糖	40

表3. ビオチンの定量操作方法

試験管 No.	ビオチン量(ng/ tube)	2倍濃度基礎 培地(ml)	1ng/ml biotin 標 準液 (μ l)	0.5M KPB pH7.0(μ l)	超純水 (μ l)
1	0	1	0	200	800
2	0.02	1	20	200	780
3	0.04	1	40	200	760
4	0.06	1	60	200	740
5	0.08	1	80	200	720
6	0.1	1	100	200	700
Sample	x	1	10	200	790

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

9. ビタミン C

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 C の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中アスコルビン酸測定方法

1-1. 試薬作成方法

Ascorbic acid (AsA) 標準 (用事調製)

L-Ascorbic acid = 176.13

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

1) 5 mM の AsA 標準溶液を作成した。

L-Ascorbic acid を 0.0088 g 秤量し, 5% HPO₃ 10 ml に溶解した。

2) 50 μM* の AsA 標準溶液を作成した。

1) を 0.05 ml 取り, 5% HPO₃ 4.95 ml 加えて 100 倍希釈した。

3) 2) の吸光度を測定し, ε_{243.2 nm} = 10000 より正確な濃度を求め, これを標準液とした。(図 1)

AsA を溶解させる溶媒を 5% HPO₃ の代わりに超純水にすると ε_{265 nm} = 11500 となる。

標準 1 : 50 μM AsA 標準溶液* 50 μl

+5% HPO₃ 50 μl

標準 2 : 50 μM AsA 標準溶液* 100 μl

1% SnCl₂/5% HPO₃ (2. の操作は用時)

Tin(II) Chloride = 189.62

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

Metaphosphoric Acid, Lump Assay 37%

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

$5 \times 100 / 37 \times 10 / 100 = 1.35135$

1) メタリン酸 (HPO₃) を 1.35 g 秤量し, 超純水で 10 ml とした。

2) 塩化スズを 0.1 g 秤量し, 1) に溶解させた。(使用するまで水冷)

0.2% Dichloroindophenol 溶液

(冷蔵, 遮光保存, 毎週新調)

2,6-Dichloroindophenol-indophenol Sodium salt dihydrate = 326.11 (MERCK, 遮光保存)

2,6-Dichloroindophenol-indophenol Sodium salt dihydrate を 0.1 g 秤量し, 超純水で 50 ml にした。

2% Dinitrophenyl hydrazine /4.5M H₂SO₄

(遮光, 常温保存, 毎月新調)

2,4-Dinitrophenyl hydrazine = 198.14

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

Sulfuric acid = 98.08

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

$98.08 \times 4.5 \times 100 / 1000 = 44.136$

1) 硫酸 44 ml と超純水 56 ml を混合した。(水冷しながら)

2) 2,4-Dinitrophenyl hydrazine を 2 g 秤量し, 1) に溶解させた。

0.1% (C₂H₅)₃N (冷蔵保存)

Triethylamine = 101.19

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

Phosphoric acid = 98.00

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

1) (C₂H₅)₃N を 10g 秤量し, 約 80ml の超純水を加えた。

2) 1) に市販のリン酸を滴下し, pH を 3.0 にした。

3) 超純水で全量を 100ml にした。(10% (C₂H₅)₃N)

4) 移動相作成時に 3. を超純水で 100 倍希釈した。(0.1% (C₂H₅)₃N)

1-2. 試料調製方法

尿前処理

採尿後, 10%メタリン酸で 2 倍希釈したものを尿サンプルとした。

使用するまで -20°C で保存。

複数回の測定による解凍を避けるため, エッペンドルフに, 尿 0.5ml と 10%メタリン酸 0.5ml を入れたものを複数本作成した。(ラット尿の処理の場合は, 他の測定サンプル用に

0.1 M HCl で一定量にメスアップした尿を
10%メタリン酸で2倍希釈。) (以降の操作は、図2に示す。)

1-3. 測定条件

カラム：Waters μ Bondasphere 5 μ C18-100A
(ϕ 150 \times 3.9mm)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル 500ml に 0.1% トリ
エチルアミン(C₂H₅)₃N(pH3.0)溶液
を加え 1000 ml にしたもの

流速：1.0 ml / min

検出器：UV DETECTOR SPD-10Avp
SHIMADZU

検出方法：505 nm

1-4. 計算方法

1) 5.289 \times 10⁻⁵ M の AsA 標準溶液(標準 1, 2)
を 100 μ l をサンプルと同様に処理して
20 μ l インジェクションした。(317.34pmol
インジェクトした。) (図3)

- ・ 100 μ l 使用
- ・ 酢酸エチル層 1000 μ l 中 600 μ l 採取
- ・ アセトニトリル 200 μ l 中 20 μ l インジェクシ
ョン

そして、1pmol あたりの AREA を計算した。
(約 600 / pmol)

標準 1 (2.64 \times 10⁻⁵ M) 20 μ l 中 158.67 pmol

標準 2 (5.29 \times 10⁻⁵ M) 20 μ l 中 317.34 pmol

2) (検出 AREA / 1pmol 当たりの AREA)
 \times (1000 μ l / 600 μ l) \times (200 μ l / 20 μ l) \times
(24 時間尿の全量 ml / 0.05 ml) \times 1 / 1000
= ___ nmol / day

(例)

1. ラット尿 (図4)

139421 / 553 \times 1000 / 600 \times 200 / 20 \times 25 / 0.05
 \times 10⁻³ = 2100.98 nmol / day

2. ヒト尿 (図5)

181256 / 600 \times 1000 / 600 \times 200 / 20 \times 1885 /
0.05 \times 10⁻³ = 189.82 nmol / day

2. HPLC による食品中のビタミン C 測定方 法

2-1. 試薬作成方法

1%SnCl₂ / 20%HPO₃ (2) の操作は用事)

Tin(II)Chloride = 189.62

(和光純薬工業株式会社、常温保存)

Metaphosphoric Acid, Lump Assay37%

(和光純薬工業株式会社、常温保存)

20 \times 100 / 37 \times 20 / 100=10.81

1) メタリン酸 (HPO₃) を 10.81g 秤量し、超
純水で 20ml とした。

2) 塩化スズ(SnCl₂)を 0.2g 秤量し、1) に溶解
させた。(使用するまで氷冷)

10%タカジアスターゼ溶液 (用事調製)

タカジアスターゼ (三共株式会社、常温保存)

タカジアスターゼ 1g を秤量し、超純水
10ml に溶解させた。

PBS (冷蔵保存)

Phosphate Buffered Salts Tablets

(TAKARA SHUZO, 常温保存)

PBS 1 錠を超純水 100 ml に溶解させた。

以下、尿中総アスコルビン酸測定と同じ試
薬を使用

2-2. 試料調製方法

食品を用いた時のビタミン C 定量用 HPLC
試料調整のための操作方法を 図6 に示した。

2-3. 測定条件

尿中総アスコルビン酸測定条件と同様

2-4. 計算方法

1) AsA 標準を流し、1pmol あたりの AREA
を計算した。(約 600 / pmol)

2) サンプル全量 (g) \times (6500 μ l / 100 μ l) \times
(1000 μ l / 100 μ l) \times (サンプルの検出 AREA /
1pmol 当たりの AREA) \times (1000 μ l / 600 μ l) \times
(200 μ l / 20 μ l) \times (1 / 1000)
= ___ nmol

*食事ホモジネート 1g と PBS 5 ml を合わせ
た容積を 6 ml とした。

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

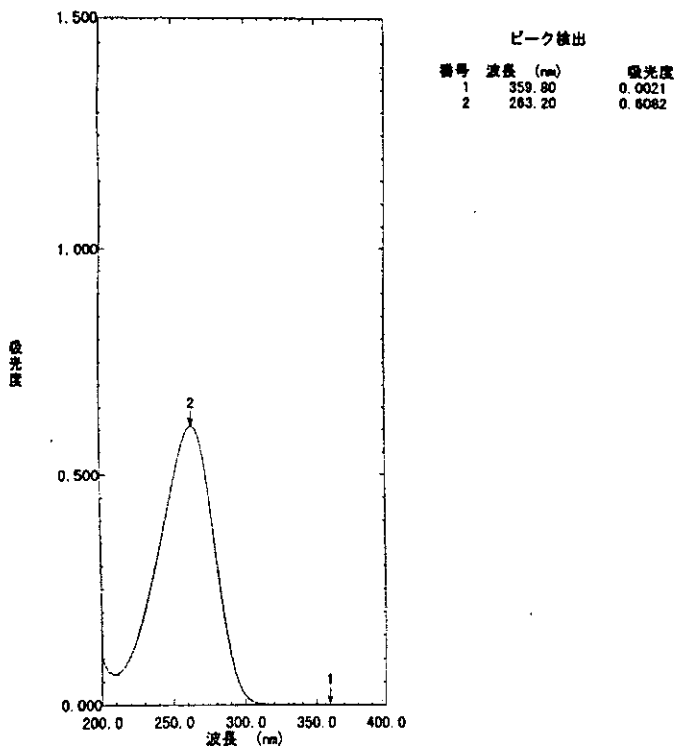
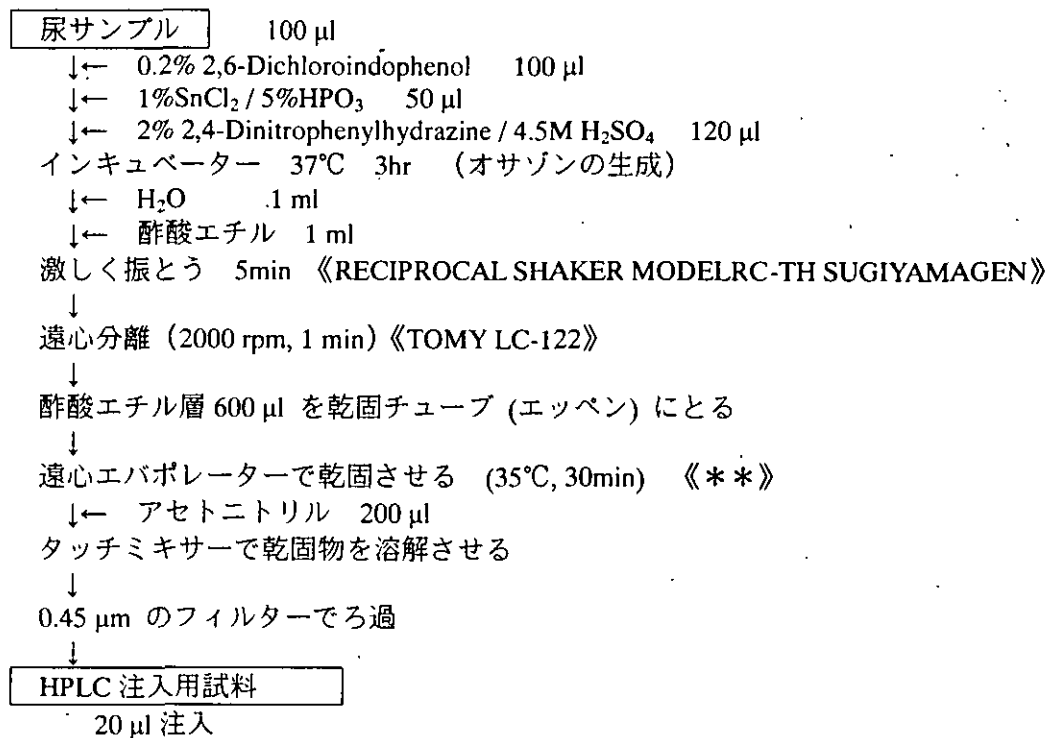


図. アスコルビン酸の UV スペクトラム

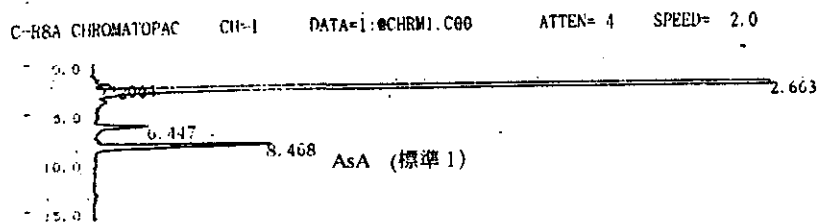


**遠心エバポレーター Centrifugal Evaporator HITACHI CE1
 Cold Trap HITACHI TP6D
 Diaphragm Vacuum Pump HITACHI VD3
 使用する約1時間前に Cold Trap を作動させておくこと。

(注意事項)

- ・ 遠心エバポレーターで乾固させた乾固物は冷蔵, 冷凍保存可能
- ・ 酢酸エチルを採取するピペットの先は通常のプラスチック製 (アイビス IUCHI) が使用可能。
- ・ 操作はできるだけ手早く行うこと。(酢酸エチルやアセトニトリルが揮発してしまわないように)
- ・ バイアルの蓋のセプタムはアルミ製 (SIL-6A 島津 GLC) のものを使用し, 1回使い切りとする。

図2. 尿中アスコルビン酸測定のための HPLC 用試料の調整方法

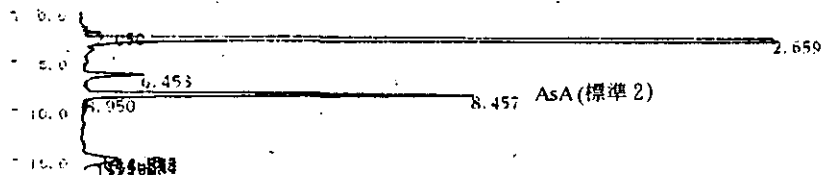


C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No. -1:CHRMI.C00 04/01/09 22:28:00

** CALCULATION REPORT **

CH PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	2.663	3890205	368962		97.4478	
	4	6.447	18732	1141		0.4692	
	5	8.468		3997		2.083	
TOTAL		3992091	374100			100	

C-R8A CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:CHRMI.C01 ATTEN= 4 SPEED= 2.0



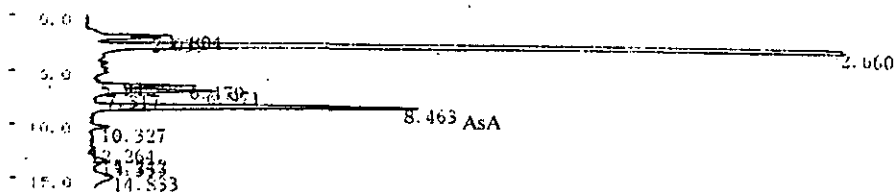
C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=2 DATA=1:CHRMI.C01 04/01/09 22:45:56

** CALCULATION REPORT **

CH PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
2	2.659	4133899	390868			95.2779	
3	6.453	20574	1262			0.4742	
4	8.457		8834	S		4.2479	
TOTAL		4336779	400965			100	

図3. アスコルビン酸標準の HPLC クロマトグラム の例

C-R8A CHROMATOPAC CH=1 DATA=1:CHRMI.C02 ATTEN= 4 SPEED= 2.0

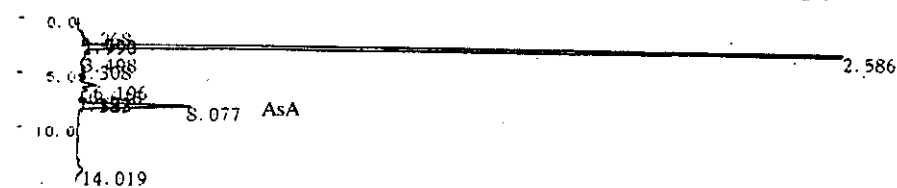


C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=3 DATA=1:CHRMI.C02 04/01/09 23:03:54

** CALCULATION REPORT **

CH PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	1.804	14464	1481		0.3556	
2	2	2.039	13407	1247	V	0.3296	
3	2	2.66	3817884	363412		93.8529	
5	6	6.479	38590	2050	V	0.9486	
6	6	6.971	44180	2415	V	1.086	
8	8	8.463		6739		3.4273	

図4. 尿 (ラット) を試料としたときの HPLC のクロマトグラム の例



C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=3 DATA=1:CHRMI.C02 03/09/08 16:31:26

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4	2.586	3892959	409092			94.2168	
	7	6.196	28799	1488			0.697	
	8	6.646	12218	720	V		0.2957	
	11	8.077	181256	9414			4.3867	
	12	14.019	16681	428			0.4037	
TOTAL			4131913	421143			100	

図5. 尿（ヒト）を試料としたときの HPLC のクロマトグラム の例

前処理

〈測定法 Kishida et al. Anal. Chem. 1992, 64, 1505-1507 より〉

食品 1g を秤量し、5 ml の PBS を加える

↓

ホモゲナイズし、ホモジネート 100 μl に 1% SnCl₂ in 20% HPO₃ 900 μl を加える

↓

攪拌後、10000 rpm, 5 min, 4°C で遠心分離

↓

上清をサンプル液とする

実際行った前処理

食品をフードプロセッサー (National MK-K77-W) でホモゲナイズし、-20°C で冷凍保存した。

↓

解凍後、1g 秤量し、PBS 5ml を加えて攪拌した。

↓

10% タカジアスターゼ溶液 500 μl を加えて攪拌後、インキュベーターで 37°C, 80min 加温した。

↓

ホモジネート 100 μl に 1% SnCl₂ in 20% HPO₃ 900 μl を加えた。

↓

攪拌後、10000rpm, 5min, 4°C で遠心分離

↓

上清をサンプル液とした。

以降の操作は尿中の総アスコルビン酸測定法と同様 (図2)
(食品サンプル量を 100 μl として処理開始)

図6. 食品中アスコルビン酸測定のための HPLC 用試料の調整方法

平成 15 年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

10. トリプトファン-キノリン酸関連代謝産物

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したトリプトファン-キノリン酸関連代謝産物の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC を用いた尿中アンスラニル酸 (Anthranilic acid: AnA) 測定法

1-1. 試薬作成方法

AnA 標準 (凍結保存)

Anthranilic acid=137.14 (和光純薬工業株式会社, 室内保存)

1) 1 mg/ml の AnA を作成 (in メタノール) AnA を 0.0019 g 秤量し, メタノールを 1.9 ml 加えた。

2) 50 倍希釈する。1) を 0.1 ml 取り, メタノールを 4.9 ml 加えた。

3) 2) の吸光度を測定し (対照セルにはメタノールをいれる), $\epsilon_{333\text{nm}} = 3990$ より正確な値を求めた。 ($0.2742 / 3990 = 6.87 \times 10^{-5} \text{M}$)

4) さらに 50 倍希釈する。2) を 0.02 ml 取り, メタノールを 0.98 ml 加えて, さらに 50 倍希釈し, この液を標準として ($1.37 \times 10^{-6} \text{M}$), 20 μl インジェクトした。標準のスペクトルを図 1 に示した。

1M KH₂PO₄ (pH 3.0)

リン酸二水素カリウム=136.09 g

リン酸二水素カリウム 136.09 g を秤量し, 水を 800 ml 程度加え, 完全に溶解させる。pH メーターを利用して, リン酸を滴下して, pH を 3.0 に調整した。その後, 水で 1000 ml にした。

1-2. 試料作成方法

尿

- ↓ 遠心分離 2000rpm, 5 min
- ↓ (卓上多本架遠心機 LC-122)
- ↓ 0.45 μm のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

1-3. 測定条件

移動相: 1M KH₂PO₄ (pH 3.0) 50 ml
超純水 600 ml
アセトニトリル 350 ml

流速: 1.0 ml/min

PRESSURE: 140 kgf/cm² 程度

カラム: TOSOH TSK-GEL ODS-80 Ts
($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$)

カラム温度: 40 °C

検出器: SHIMADZU RF-10AXL

データプロセッサー: SHIMADZU CR-8A

検出方法: 蛍光法 (励起波長 340 nm, 蛍光波長 410 nm)

1-4. 計算方法

1) AnA 標準 ($1.37 \times 10^{-6} \text{M}$) を 20 μl インジェクトした (27.4 pmol インジェクトした)。1 pmol あたりの面積を計算する。(図 2)
例) $1048111 / 27.4 = 38252 / \text{pmol}$

2) AREA / 1 pmol あたりの面積 \times 一日の尿量 (ml) / 0.02 ml $\times 10^{-3} =$ _____ nmol/day

※ 0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 3)

$965815 / 38252 \times 25 / 0.02 \times 10^{-3} = 32 \text{ nmol/day}$

2. HPLC を用いた尿中キノレン酸 (Kynurenic acid: KA) 測定法

2-1. 試薬作成方法

KA 標準 (凍結保存)

Kynurenic acid= 207.19 (和光純薬株式会社, 室内保存)

1) 0.1 mg/ml の KA を作成。 (in 0.6 M PCA) KA を 0.0004 g 秤量し, 0.6 M PCA を 4 ml 加えてスターラーで溶解させた。

2) 20 倍希釈する。1) を 0.2 ml 取り, 0.6 M PCA を 3.8 ml 加えた。

3) 2) の吸光度を測定し (対照セルには 0.6 M PCA を入れる), $\epsilon_{243\text{nm}} = 42500$ より正確な濃度を求め, この液を標準として 20 μl インジェクトした. ($0.3889 / 42500 = 9.15 \times 10^{-6}$ M) 標準のスペクトルを図 4 に示した.

0.6 M PCA (室内保存)

Perchloric acid = 100.46 (和光純薬株式会社, 室内保存)

70% PCA (11.65 M) 1.0 ml に超純水を 18.4 ml 加えた.

0.5 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)

Sodium Acetate Trihydrate = 136.08 (和光純薬株式会社, 室内保存)

1) ビーカーに酢酸ナトリウム三水和物を 68.04 g 秤量して約 800 ml の超純水を入れ, スターラーで溶解後, 1 L にメスアップした. (0.5 M 酢酸ナトリウム)

2) 酢酸 (17.4 M) 1 ml に超純水を 33.8 ml 加えた. (0.5 M 酢酸)

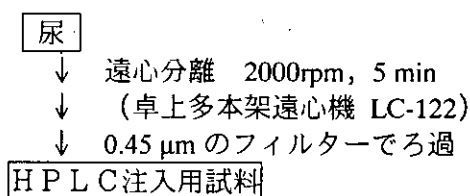
3) 1) を 2) で pH 4.5 に合わせた.

1 M 酢酸亜鉛 (室内保存)

Zinc Acetate Dihydrate = 219.51 (和光純薬株式会社, 室内保存)

ビーカーに酢酸亜鉛を 219.51 g 秤量して約 800 ml の超純水を入れ, スターラーで溶解後, 1 L にメスアップした.

2-2. 試料作成方法



2-3. 測定条件

移動相: 0.5 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 20 ml
 超純水 980 ml
 アセトニトリル 52.6 ml

流速: 1.0 ml / min

PRESSURE: 112 kgf / cm^2 程度

カラム: TOSOH ODS-80Ts ($\phi 4.6 \times 250$ mm)

カラム温度: 40°C

検出器: HITACHI F-1050

データプロセッサ: HITACHI D-2500

検出方法: 蛍光法 (励起波長 344 nm, 蛍光波長 398 nm)

*ポストカラム液: 1 M 酢酸亜鉛 (1 ml / min)

図 5 にキヌレン酸測定用の HPLC のシステムの概略を示した.

2-4. 計算方法

1) KA 標準 (9.15×10^{-6} M) を 20 μl インジェクトした (183 pmol インジェクトした). 1 pmol あたりの面積を計算する. (図 6)

例) $1537325 / 183 = 8401 / \text{pmol}$

2) AREA / 1 pmol あたりの面積 \times 一日の尿量 (ml) / $0.02 \text{ ml} \times 10^{-3} = \text{nmol} / \text{day}$

※ 0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 7)

$2439925 / 8401 \times 25 / 0.02 \times 10^{-3}$

= 363 nmol / day

3. HPLC を用いた尿中 3-ヒドロキシアンスラニル酸 (3-Hydroxyanthranilic acid: 3-HA), 尿中キサントレン酸 (Xanthurenic acid: XA) 測定法

3-1. 試薬作成方法

3-HA 標準 (凍結保存)

3-Hydroxy anthranilic acid = 153.14 (東京化成工業株式会社, 室内保存)

1) 0.1 mg / ml の 3-HA を作成 (in メタノール). 3-HA を 0.0014 g 秤量し, メタノールを 14.0 ml 加えてスターラーで溶解させた.

2) 5 倍希釈する. 1) を 1.0 ml 取り, メタノールを 4.0 ml 加えた.

3) 2) の吸光度を測定し (対照セルにはメタノールを入れる), $\epsilon_{340\text{nm}} = 3860$ より正確な濃度を求めた. ($0.5774 / 3860 = 1.50 \times 10^{-4}$ M)

4) さらに 100 倍希釈する. 3) を 0.01 ml 取り, メタノールを 0.99 ml 加えて 100 倍希釈し, この液を標準として (1.50×10^{-6} M), 20 μl インジェクトした.

標準のスペクトルを図 8 に示した.

XA 標準 (凍結保存)

Xanthurenic acid = 205.17 (和光純薬株式会社, 室内保存)

1) 0.1 mg / ml の XA を作成 (in 移動相). XA を 0.0008 g 秤量し, 移動相を 8.0 ml 加えてスターラーで溶解させた.

2) 1) の吸光度を測定し (対照セルには移動相を入れる), $\epsilon_{340\text{nm}} = 8648$ より正確な濃度を求め, この液を標準として, 20 μl インジェクションした. ($0.5645 / 8648 = 6.53 \times 10^{-5}$ M)

標準のスペクトルを図 9 に示した.

1 M KH_2PO_4 (pH 3.0)

リン酸二水素カリウム=136.09

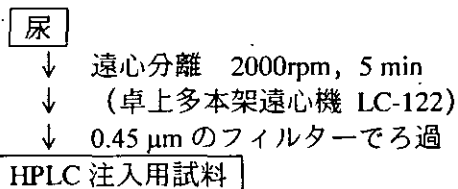
リン酸二水素カリウム 136.09 g を秤量し、水を 800 ml 程度加え、完全に溶解させる。pH メーターを利用して、リン酸を滴下して、pH を 3.0 に調整した。その後、水で 1000 ml にした。

3 mg/ml EDTA-2Na (冷蔵保存)

EDTA-2Na= 372.24 (和光純薬株式会社、室内保存)

EDTA-2Na を 0.0162 g 秤量し、超純水を 5.4 ml 加えた。

3-2. 試料作成方法



3-3. 測定条件

移動相：1 M KH ₂ PO ₄ (pH 3.0)	50 ml
超純水	949 ml
3 mg/ml EDTA-2Na	1 ml
アセトニトリル	100 ml

流速：1.0 ml/min

PRESSURE：85 kgf/cm²

カラム：STR ODS-II (φ4.6×250mm)

カラム温度：40°C

検出器：

3-HA——SHISEIDO NANOSPACE SI-2
XA——SHIMADZU SPD-10AVVP

データプロセッサ：

3-HA——SHIMADZU CR-8A
XA——SHIMADZU CR-6A

検出方法：

3-HA——電気化学検出器 印加電圧
+500 mV

XA——紫外分光光度計 UV 法 (340 nm)

3-HA と XA の同時定量方法の HPLC のシステムを図 10 に示した。

3-4. 計算方法

3-HA：

1) 3-HA 標準 (1.50×10⁻⁶ M) を 20 μl インジェクトした (30 pmol インジェクトした)。1 pmol あたりの面積を計算する。(図 11)

例) 589861 / 30 = 19662 / pmol

2) AREA / 1 pmol あたりの面積× 一日の尿量 (ml) / 0.02 ml×10⁻³ = _____ nmol / day

※ 0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 12)

1489526 / 19662 × 25 / 0.02 × 10⁻³ = 95 nmol / day

XA：

1) XA 標準 (6.53×10⁻⁵ M) を 20 μl インジェクトした (1.31 nmol インジェクトした)。1 nmol あたりの面積を計算する。(図 13)

例) 325136 / 1.31 = 248195 / nmol

2) AREA / 1 nmol あたりの面積× 一日の尿量 (ml) / 0.02 ml = _____ nmol / day

※ 0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 14)

45165 / 248195 × 25 / 0.02 = 227 nmol / day

4. HPLC を用いた尿中キノリン酸 (Quinolinic acid: QA) 測定法

4-1. 試薬作成方法

QA 標準 (凍結保存)

Quinolinic acid = 167.13 (半井化学薬品株式会社、室内保存)

1) 0.1 mg/ml の QA を作成。QA を 0.0019 g 秤量し、超純水を 19.0 ml 加え、溶解させた。

2) 5 倍希釈する。1) を 1.0 ml 取り、超純水を 4.0 ml 加えた。

3) 2) の吸光度を測定し、ε_{275nm} = 4040 より正確な濃度を求め、この液を標準として、20 μl インジェクトした。(0.4173 / 4040 = 1.03×10⁻⁴ M)

標準のスペクトルを図 15 に示した。

0.2 M クエン酸溶液

クエン酸一水和物 = 210.14

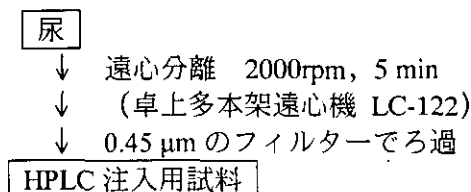
クエン酸一水和物 2.10 g を秤量し、水にて 50 ml にした。

1 M KH₂PO₄ (pH was adjusted 3.8 by 0.2 M citric acid)

リン酸二水素カリウム = 136.09

リン酸二水素カリウム 68.045 g を秤量し、水を 400 ml 程度加え完全に溶解させた。pH メーターを使用して、0.2 M クエン酸をこれに滴下し、pH 3.8 に調整後、水で 500 ml にした。

4-2. 試料作成方法



4-3.測定条件

移動相: 1 M KH_2PO_4 (pH was adjusted to 3.8 by

0.2 M citric acid) 50 ml

過酸化水素 40 ml

15% TMA (Tetramethylammonium
hydroxide solution) 30 μl

超純水で 1 L にする.

流速: 0.6ml / min

PRESSURE: 56kgf / cm^2 程度

カラム: Unisil Q C 81 ($\phi 4.6 \times 250$ mm)

カラム温度: 30°C

検出器: SHIMADZU RF - 10AXF

データプロセッサー: SHIMADZU CR - 6A

検出方法: 蛍光法 (励起波長 326 nm、蛍光波
長 380 nm)

4-4.計算方法

1) QA 標準 (1.03×10^{-4} M) を 20 μl インジェ
クトした (2.06 nmol インジェクトした).

1 nmol あたりの面積を計算する. (図 16)

例) $1205640 / 2.06 = 585262$ / pmol

2) AREA / 1 nmol あたりの面積 \times 一日の尿量
(ml) / 0.02 ml = _____ nmol / day

※ 0.02 ml = 試料注入量

例) ラット尿 (図 17)

$191815 / 585262 \times 25 / 0.02 = 410$ nmol / day

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