

9. Watanabe F, Abe K, Katsura H, Takenaka S, Mazumder ZH, Yamaji R, Ebara S, Fujita T, Tanimori S, Kirihata M, Nakano Y (1998) Biological activity of hydroxo-vitamin B₁₂ degradation product formed during microwave heating. *J Agric Food Chem* 46, 5177-5180
10. Shibata K, Kawada T, Iwai K. (1988) Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, *N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and *N*¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 424, 23-28
11. Shibata K. (1987) Ultramicro-determination of *N*¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins (Japan)* 61, 599-604
12. Skeggs HR, Wright LD. (1944) The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem*, 156, 21-26
13. Tamura T (1990) Microbiological assays of folates. In *Folic acid metabolism in Health and Disease. Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol.13 (Picciano MF, Stolstad ELR, Gregory JF III, eds) pp. 121-37, Wiley-Liss, New York, USA
14. Tamura T. (1998) Determination of food folate. *J Nutr Biochem*, 9, 285-293
15. Wright LD, Skeggs HR (1944) Determination of biotin with *Lactobacillus arabinosus*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 56, 95-98
16. Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y (1994) Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 40, 491-48
17. Kishida K, Nishimoto Y, Kojo S. (1992) Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem*, 64, 1505-1507
18. Fukuwatari T, Ohta M, Kimura N, sasaki R, Shibata K. (2004) Conversion ratio of tryptophan to niacin in Japanese women fed a purified diet conforming to the Japanese dietary reference intakes. *J Nutr Sci Vitaminol*, 50, 385-391

表 1. 適正尿中排泄量 (女子学生)

水溶性ビタミン	適正尿中排泄量
ビタミン B ₁	300 ~1200 nmol/day
ビタミン B ₂	200 ~900 nmol/day
ビタミン B ₆	3.0 ~8.0 μmol/day
ナイアシン	50 ~150 μmol/day
パントテン酸	10 ~30 μmol/day
葉酸	15 ~40 nmol/day
ビオチン	50 ~150 nmol/day
ビタミン C	150 ~2000 μmol/day

表 2. 尿中の水溶性ビタミンの安定化のための処理方法

	尿量	試薬	測定
処理なし (2 本)	9 ml	-	V.B ₁₂ , パントテン酸, ビオチン
塩酸処理 (2 本)	8.1 ml	1 M HCl 0.9 ml	V.B ₁ , V.B ₂ , V.B ₆
メタリン酸処理 (1 本)	4.5 ml	10% メタリン酸 4.5 ml	V.C
AsA 処理 (1 本)	4.5 ml	1 M AsA 0.5 ml	葉酸

1. 24 時間採尿し, 1000 ml の黒ボトル中に蓄尿した. 複数本になることもある.
2. 24 時間後, 尿をよく攪拌し, 尿量を測定した.
3. チューブに尿を 9 ml 程度とった.
4. 0.9 ml の 1 M 塩酸を入れたチューブに尿を 8.1 ml 取り, 軽く攪拌した.
5. 4.5 ml の 10% メタリン酸を入れたチューブに尿を 4.5 ml 加え, 攪拌した.
6. 0.5 ml の 1 M AsA を入れたチューブに尿を 4.5 ml 取り, 軽く攪拌した.
7. -20°C で冷凍保存した.

表 3. チアミンの HPLC 分析条件

分析カラム	COSMOSIL 5C ₁₈ -MS-II (4.6 mm I.D. × 250 mm、ナカライテスク株式会社)
移動相	0.2 M リン酸二水素ナトリウム / 0.3% アセトニトリル
移動相流速	1.0 ml / min
反応液 1	0.05% フェリシアン化カリウム
反応液 1 の流速	0.5 ml / min
反応液 2	15% 水酸化ナトリウム
反応液 2 の流速	0.5 ml / min
反応コイル	PEEK チューブ (0.5 mm I.D. × 1200 mm)
検出波長	Ex. 375 nm, Em. 450 nm
カラム温度	40°C
反応コイル温度	50°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 µl

表 4. リボフラビンの HPLC 分析条件

分析カラム	TSKgel ODS-80Ts (平均粒子直径, 5 µm ; 4.6 mm I.D. × 250 mm, 東ソー株式会社, 東京)
移動相	1 M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.5/メタノール/水 (7 : 300 : 693, v/v/v)
移動相流速	0.8 ml / min
検出波長	Ex. 445 nm, Em. 530 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	室温
試料注入量	20 µl

表 5. 4-PIC の HPLC 分析条件

分析カラム	TSKgel ODS-120A (平均粒子直径, 5 μm ; 4.6 mm I.D. \times 250 mm, 東ソー株式会社, 東京)
移動相	りん酸緩衝液 pH 2.2 / メタノール (9 : 1, v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	Ex. 355 nm, Em. 436 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 μl

表 6. Nam, 2-Py, 4-Py の HPLC 分析条件

分析カラム	CHEMCOSORB 7-ODS-L (平均粒子直径, 7 μm ; 4.6 mm I.D. \times 250 mm, 株式会社ケムコ, 大阪)
移動相	10 mM KH_2PO_4 (pH 3.0) / アセトニトリル (96 : 4, v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	260 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 μl

表 7. MNA の HPLC 分析条件

分析カラム	TSKgel ODS-80Ts (平均粒子直径, 5 μm ; 4.6 mm I.D. \times 250 mm, 東ソー株式会社, 東京)
移動相	1 g/L 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムおよび 1 mM EDTA-2Na を含 む 20 mM KH_2PO_4 (pH 3.0)-アセトニトリル (78 : 22 v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	Ex. 382 nm, Em. 440 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 μl

表 8. AsA の HPLC 分析条件

分析カラム	μ Bondasphere C ₁₈ 5 μ m 100 Å (3.9 mm I.D. × 150 mm、日本ウォーターズ株式会社、東京)
移動相	アセトニトリル / 0.1% トリエチルアミン溶液 (1 : 1, v/v)
移動相流速	1.0 ml / min
検出波長	505 nm
カラム温度	40°C
試料導入装置内温度	4°C
試料注入量	20 μ l

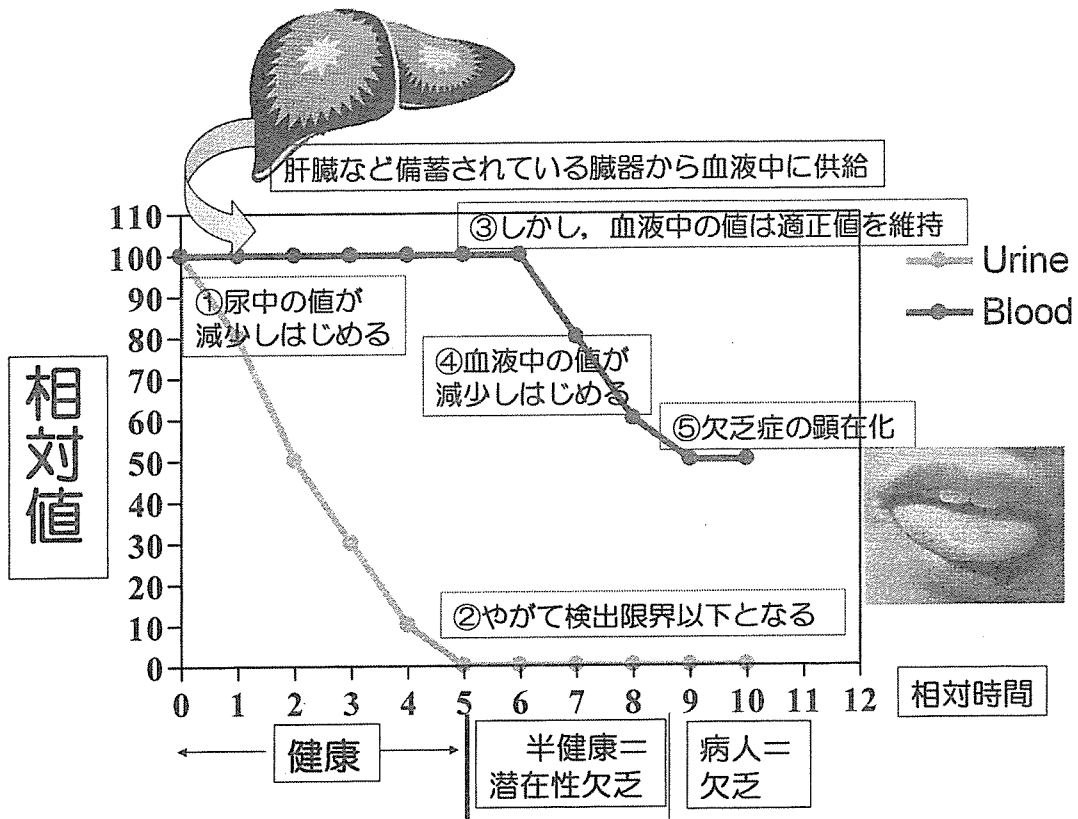


図 1. 健康人に水溶性ビタミン不足食を投与した時の血液中と尿中の水溶性ビタミンの変化量の概念図

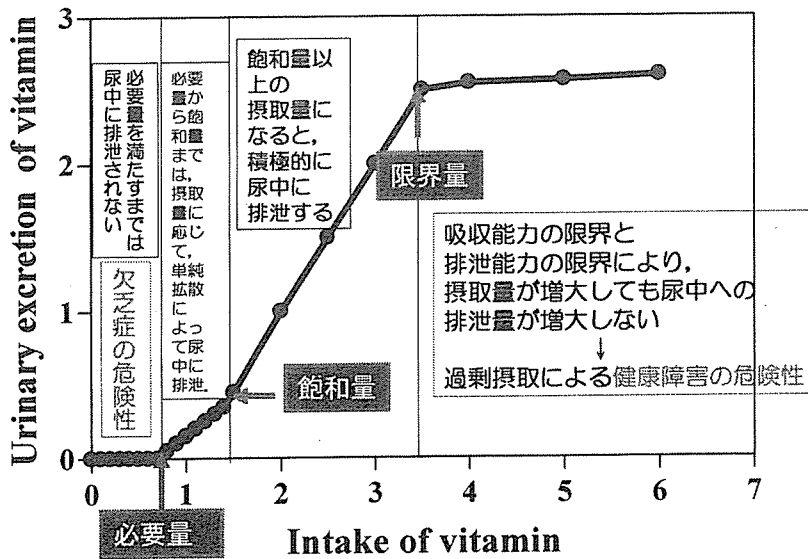


図 2. 水溶性ビタミンの摂取量と尿中への排泄量との関係の概念図

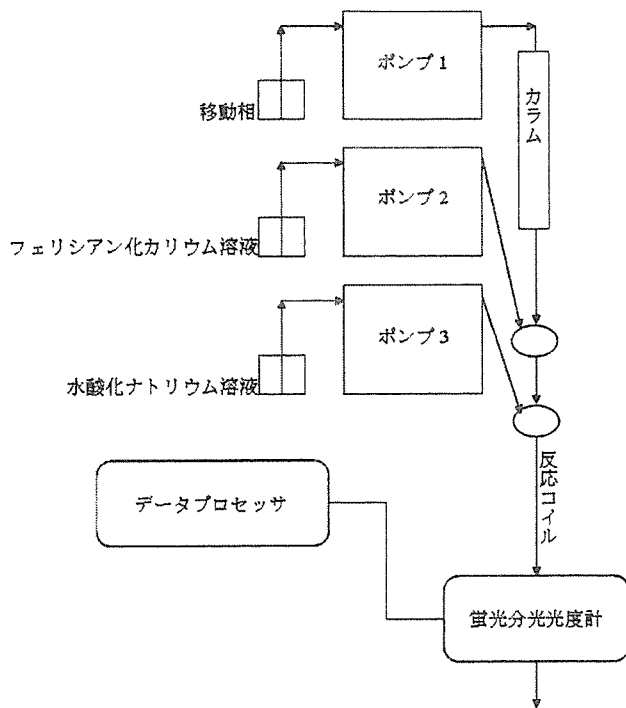


図 3. ビタミン B₁ 測定用 HPLC システム構成図

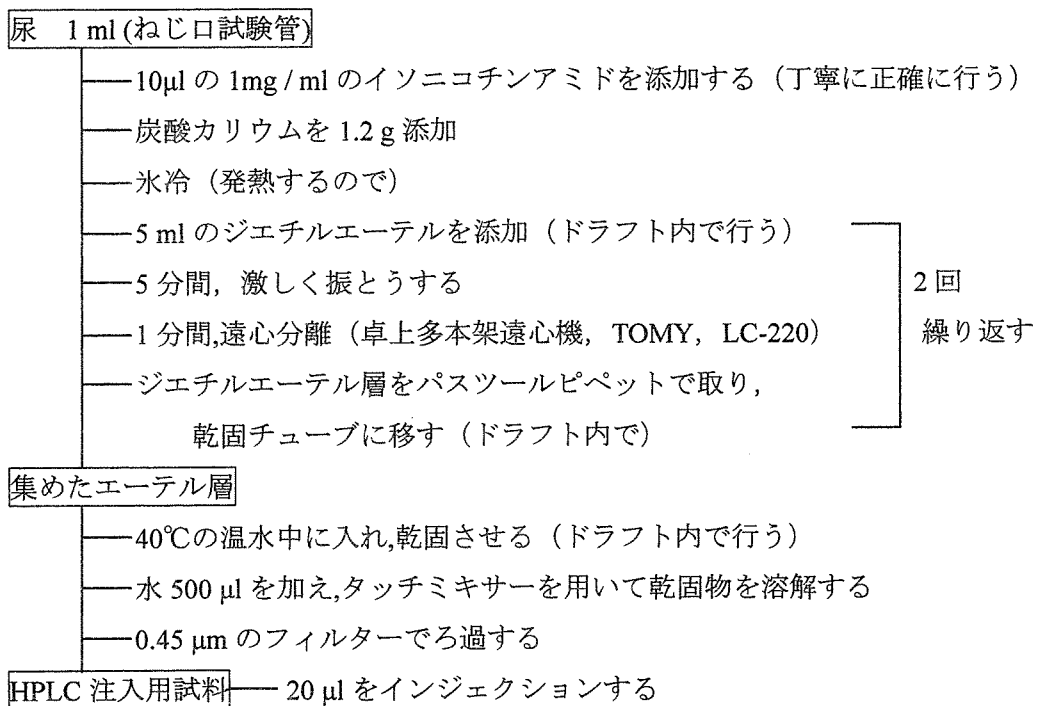


図 4. Nam, 2-Py, 4-Py 測定のために用いる尿の処理方法

- ① 20 μ l 標準 20 μ g / ml MNA 標準 20 μ l + 水 780 ml = 800 μ l
- ② 40 μ l 標準 20 μ g / ml MNA 標準 40 μ l + 水 760 ml = 800 μ l
- ③ 試料 尿 100 μ l + 水 700 μ l = 800 μ l

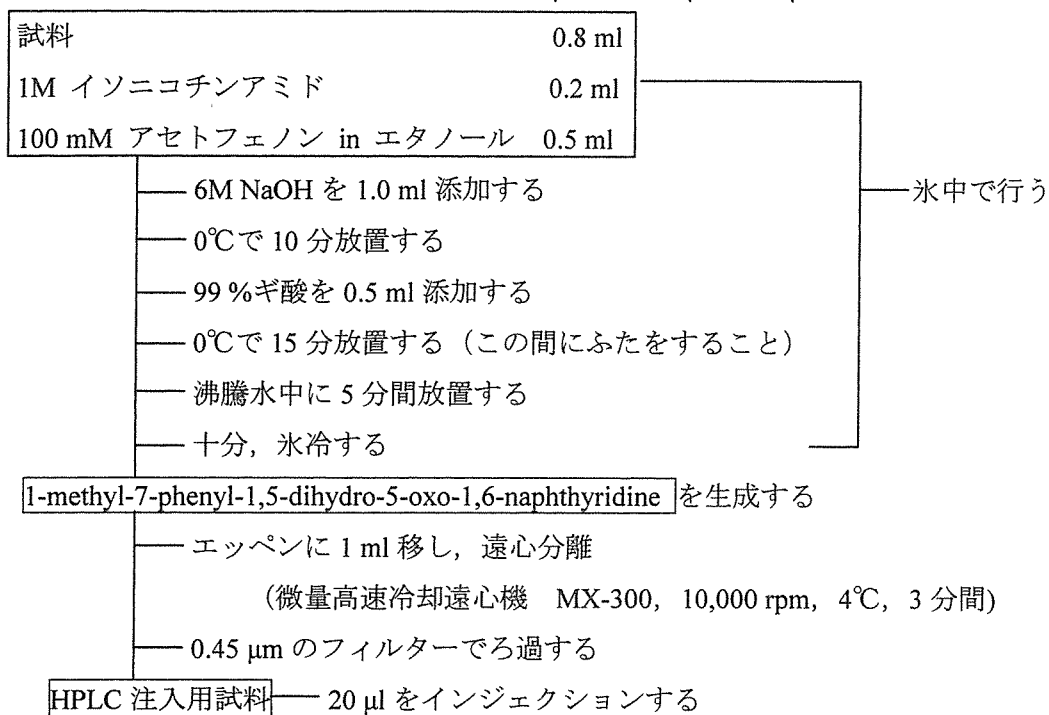
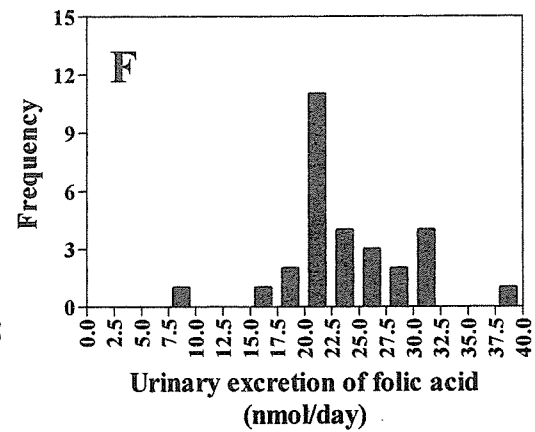
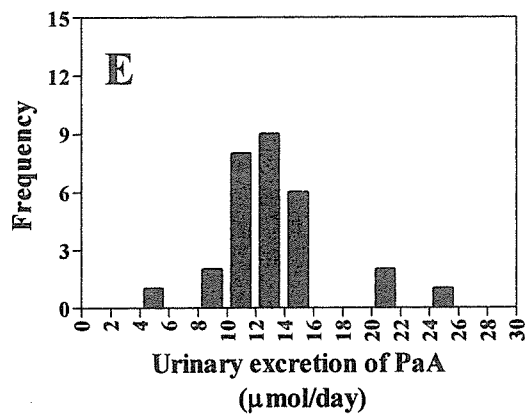
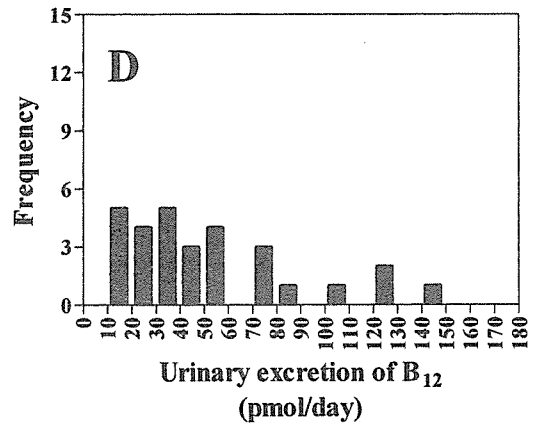
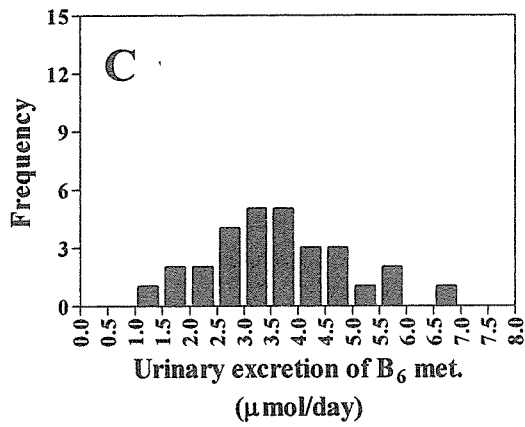
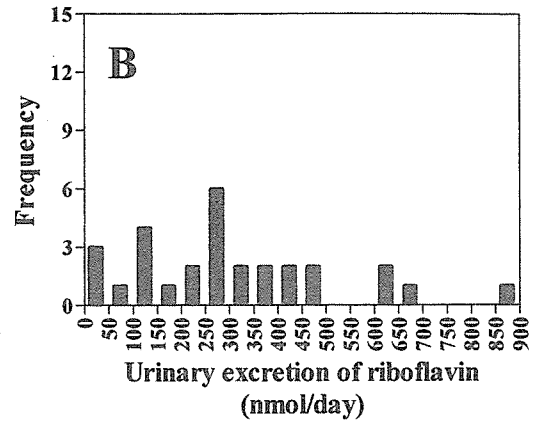
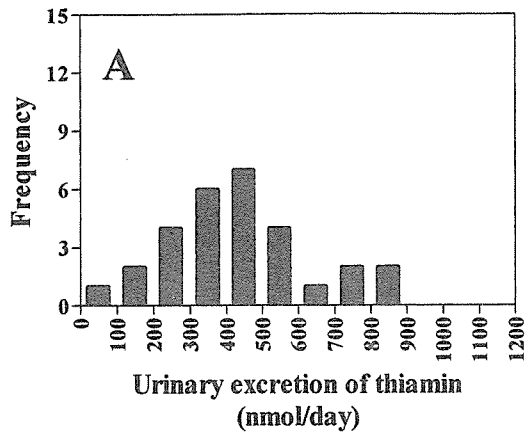


図 5. MNA 測定のために用いる尿の処理方法



次頁に続く

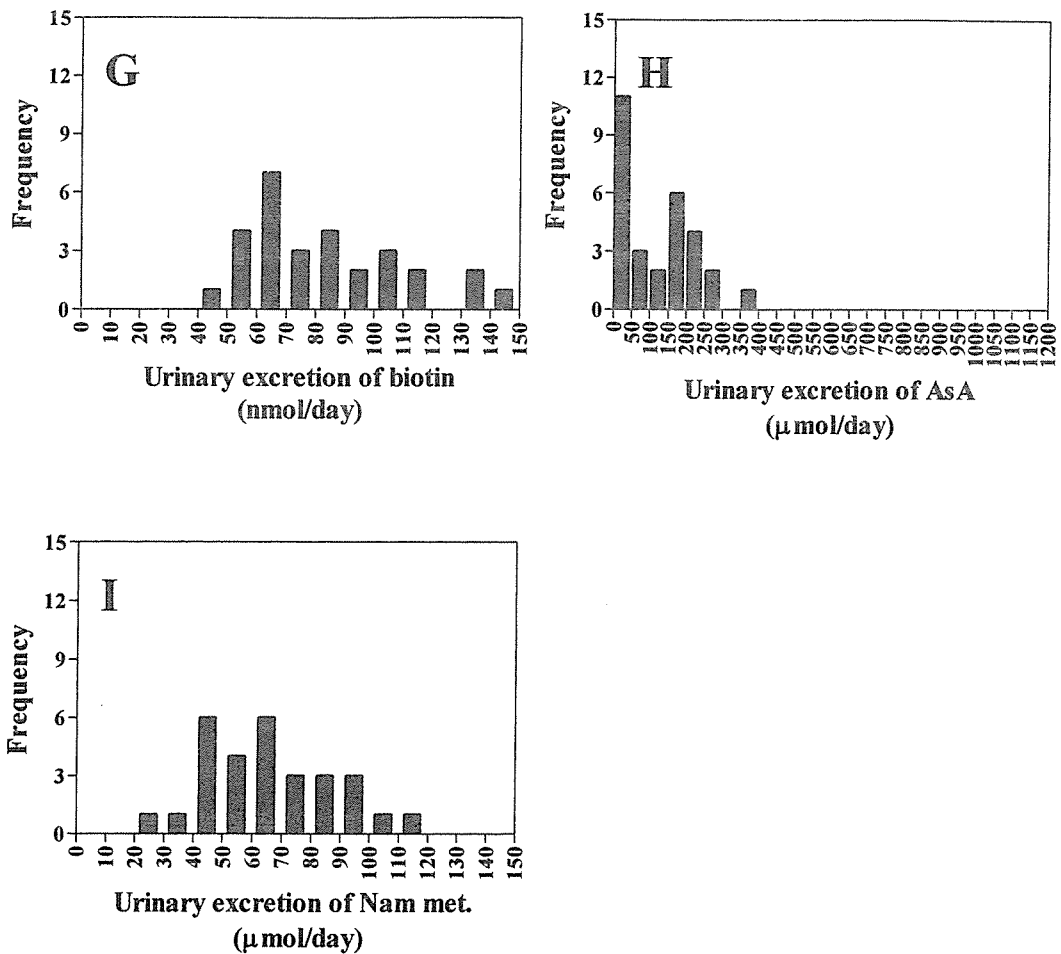


図 6. 施設-1 の女子大学生の水溶性ビタミン尿中排泄量の度数分布図

A : ビタミン B₁ 尿中排泄量 (429 ± 199 nmol / day)

B : ビタミン B₂ 尿中排泄量 (308 ± 206 nmol / day)

C : ビタミン B₆ 尿中排泄量 (3.62 ± 1.31 μmol / day)

D : ビタミン B₁₂ 尿中排泄量 (52.6 ± 35.5 pmol / day)

E : パントテン酸尿中排泄量 (13.2 ± 3.85 μmol / day)

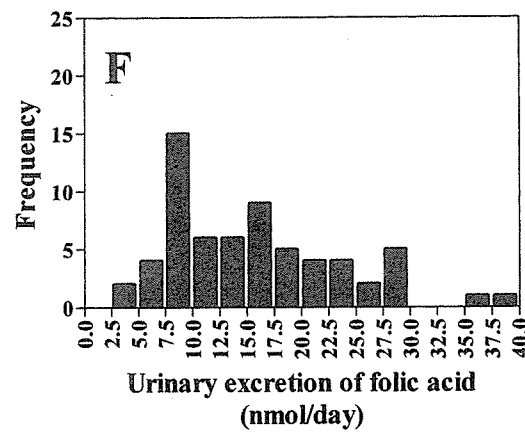
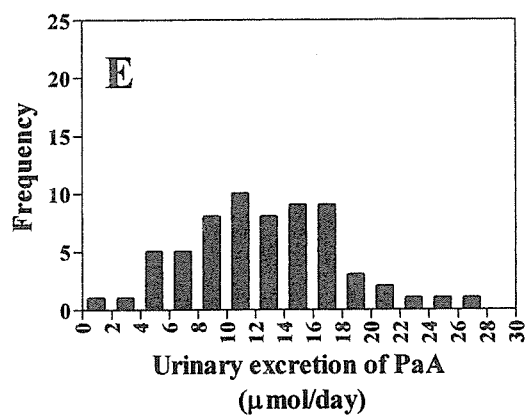
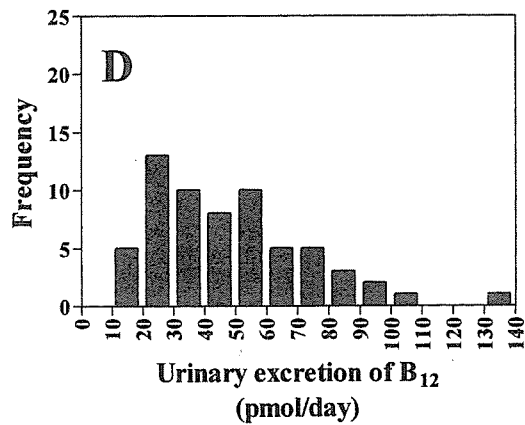
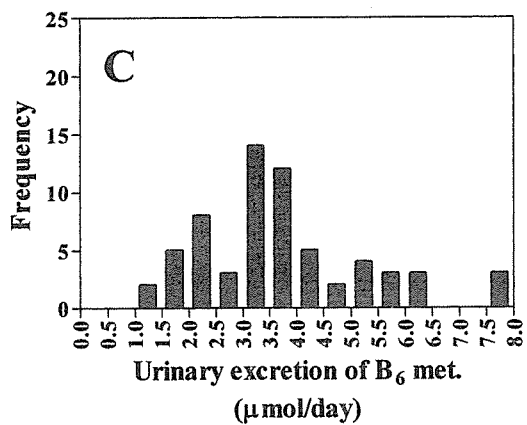
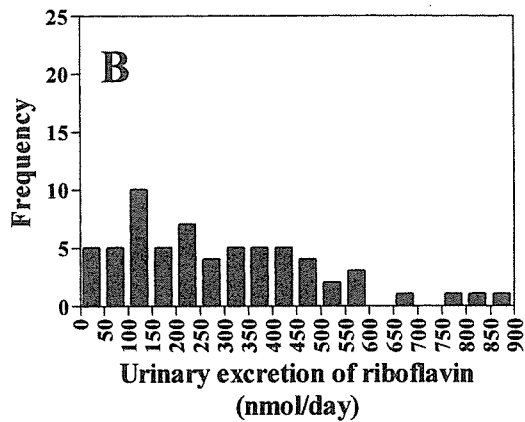
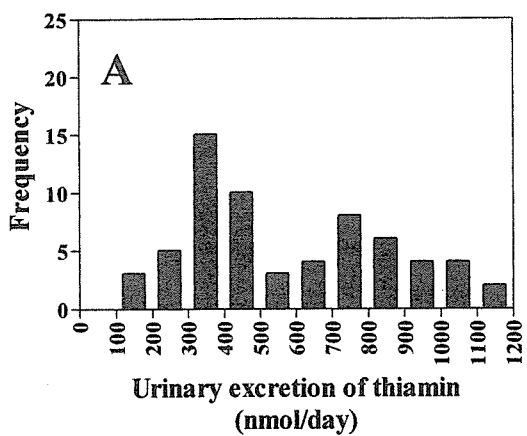
F : 葉酸尿中排泄量 (23.8 ± 5.75 nmol / day)

G : ビオチン尿中排泄量 (84.8 ± 26.4 nmol / day)

H : ビタミン C 尿中排泄量 (124 ± 96.9 μmol / day)

I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量 (65.5 ± 20.9 μmol / day)

値は平均値 ± 標準偏差 (n = 29) として示した。



次頁に続く

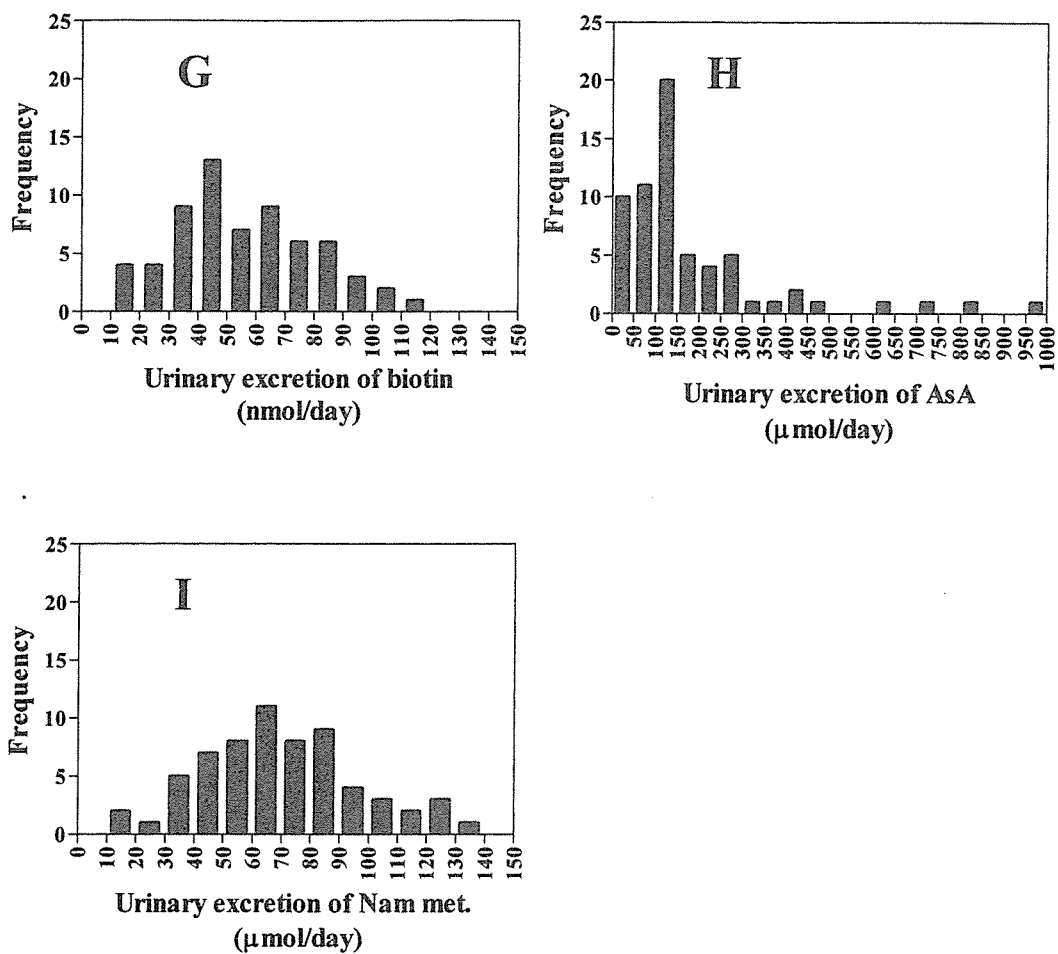


図7. 施設-2の女子学生の水溶性ビタミン尿中排泄量の度数分布図

A : ビタミン B₁ 尿中排泄量 (572 ± 280 nmol / day)

B : ビタミン B₂ 尿中排泄量 (291 ± 199 nmol / day)

C : ビタミン B₆ 尿中排泄量 (3.70 ± 1.53 μmol / day)

D : ビタミン B₁₂ 尿中排泄量 (50.6 ± 28.8 pmol / day)

E : パントテン酸尿中排泄量 (12.7 ± 5.15 μmol / day)

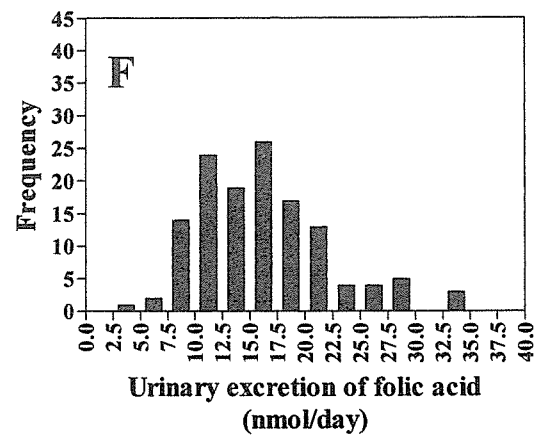
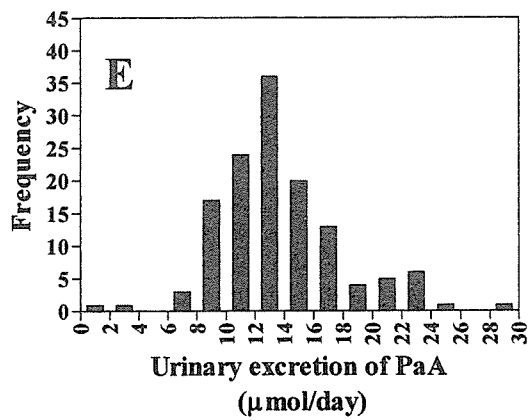
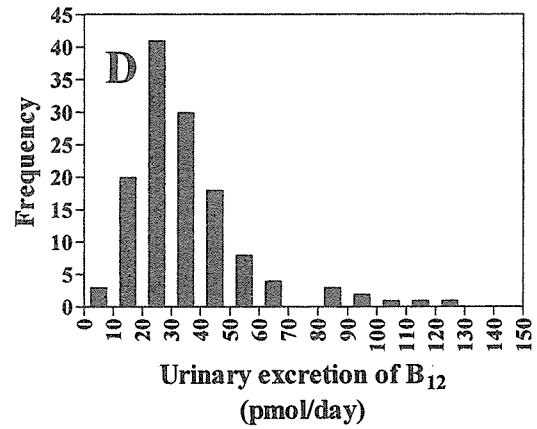
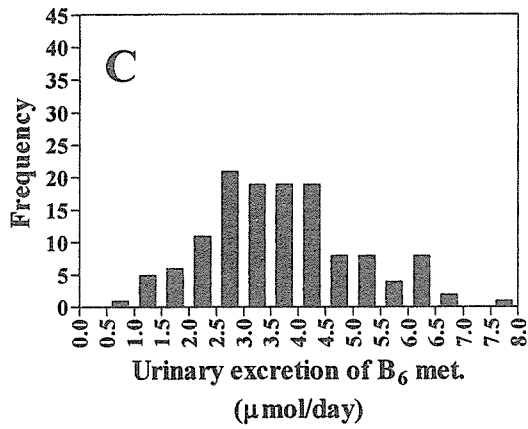
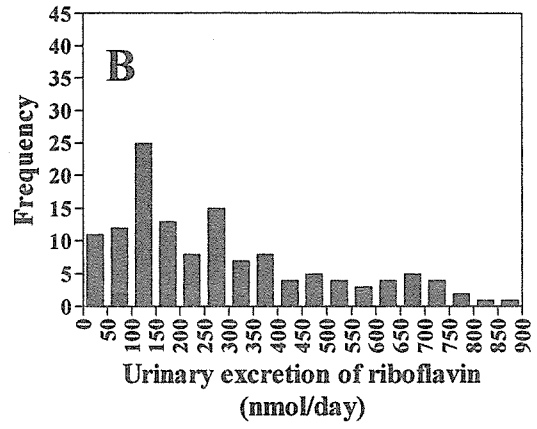
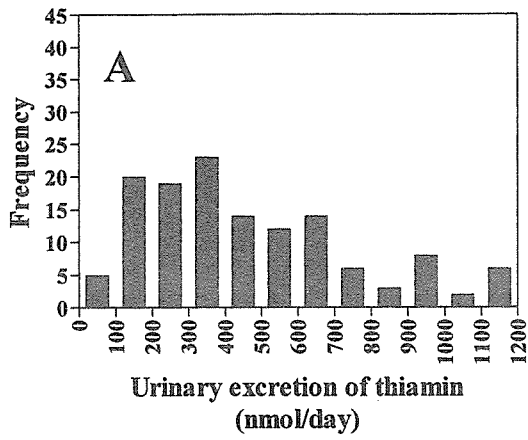
F : 葉酸尿中排泄量 (15.6 ± 8.12 nmol / day)

G : ビオチン尿中排泄量 (56.7 ± 24.6 nmol / day)

H : ビタミン C 尿中排泄量 (187 ± 192 μmol / day)

I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量 (70.3 ± 26.6 μmol / day)

値は平均値 ± 標準偏差 (n = 64) として示した。



次頁に続く

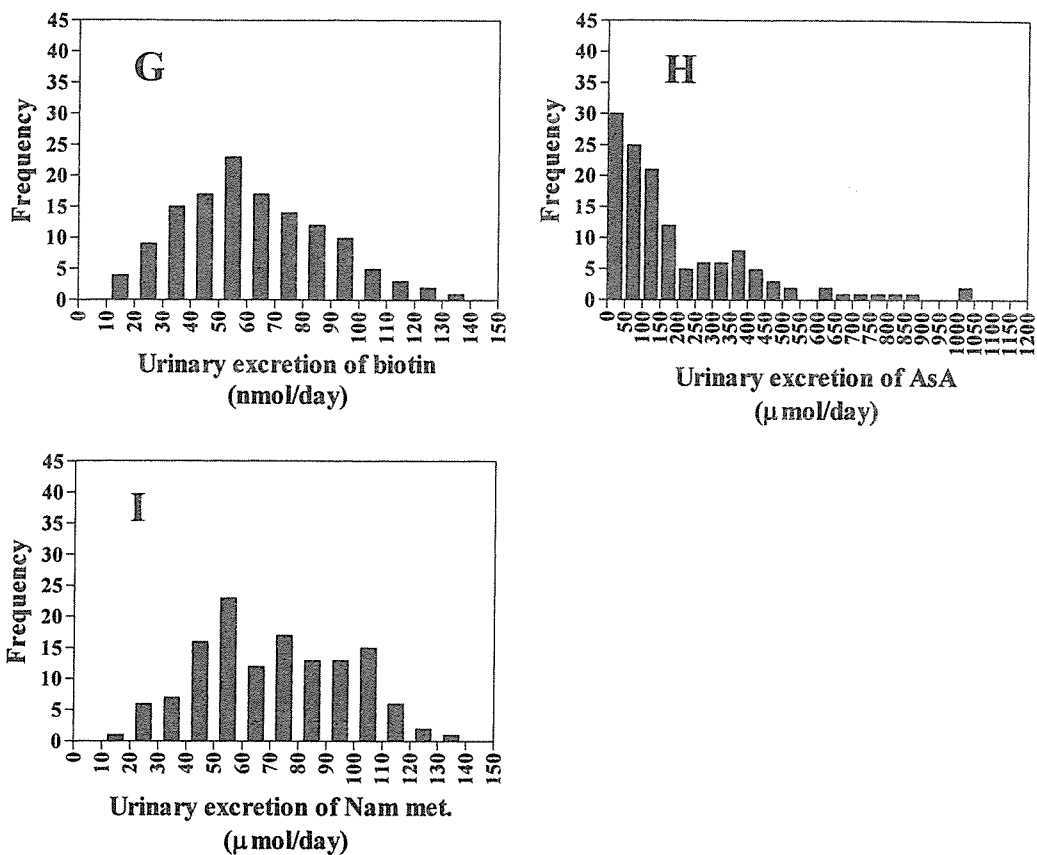


図 8. 施設-3 の女子学生の水溶性ビタミン尿中排泄量の度数分布図

A : ビタミン B₁ 尿中排泄量 (468 ± 287 nmol / day)

B : ビタミン B₂ 尿中排泄量 (287 ± 215 nmol / day)

C : ビタミン B₆ 尿中排泄量 (3.69 ± 1.35 μmol / day)

D : ビタミン B₁₂ 尿中排泄量 (36.0 ± 20.6 pmol / day)

E : パントテン酸尿中排泄量 (13.6 ± 4.18 μmol / day)

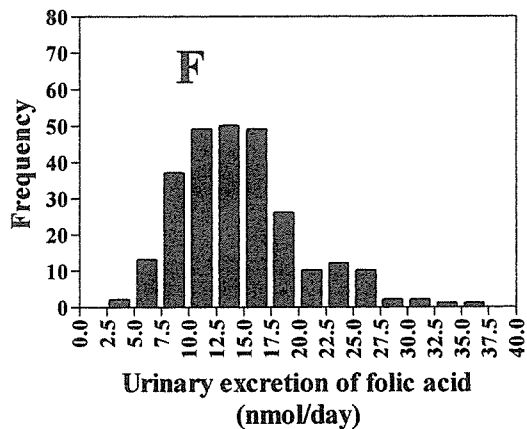
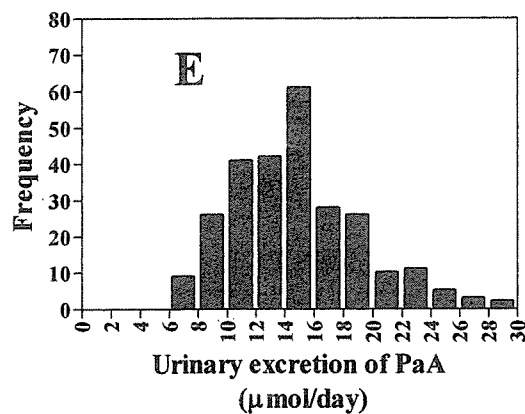
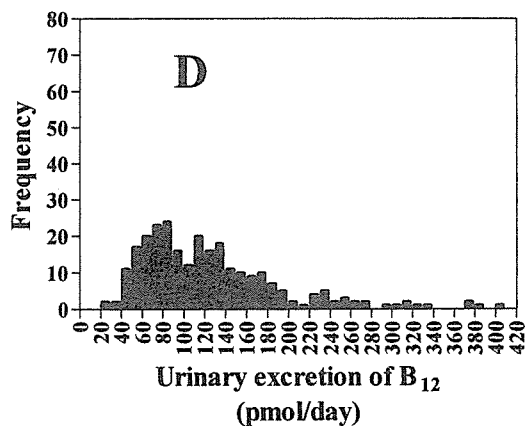
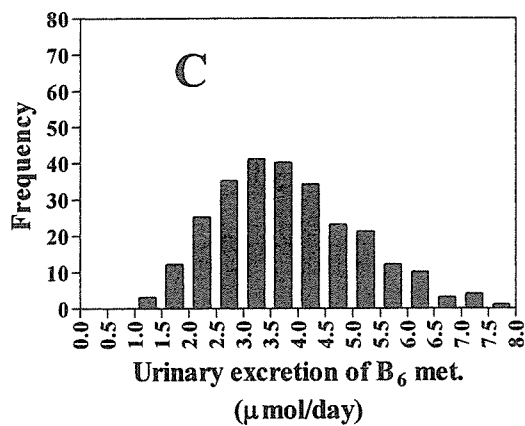
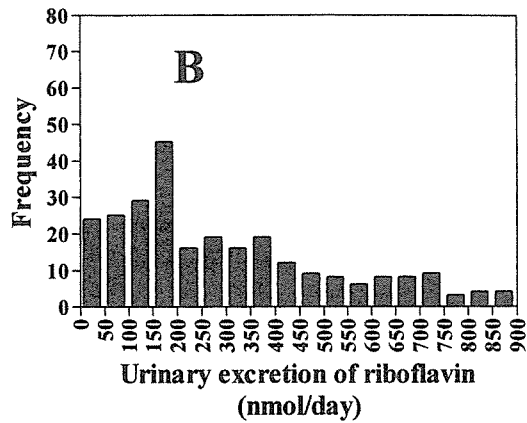
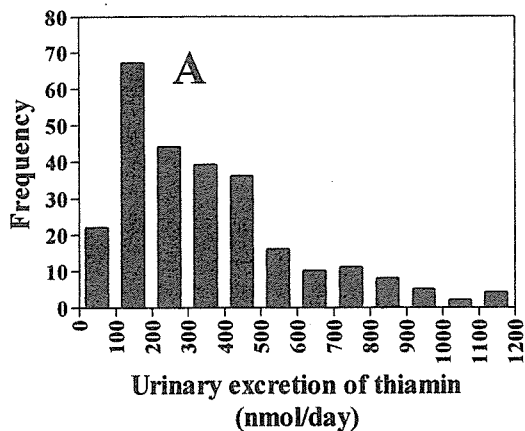
F : 葉酸尿中排泄量 (16.1 ± 5.89 nmol / day)

G : ビオチン尿中排泄量 (62.0 ± 25.8 nmol / day)

H : ビタミン C 尿中排泄量 (205 ± 213 μmol / day)

I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量 (71.3 ± 26.8 μmol / day)

値は平均値 ± 標準偏差 (n = 132) として示した。



次頁に続く

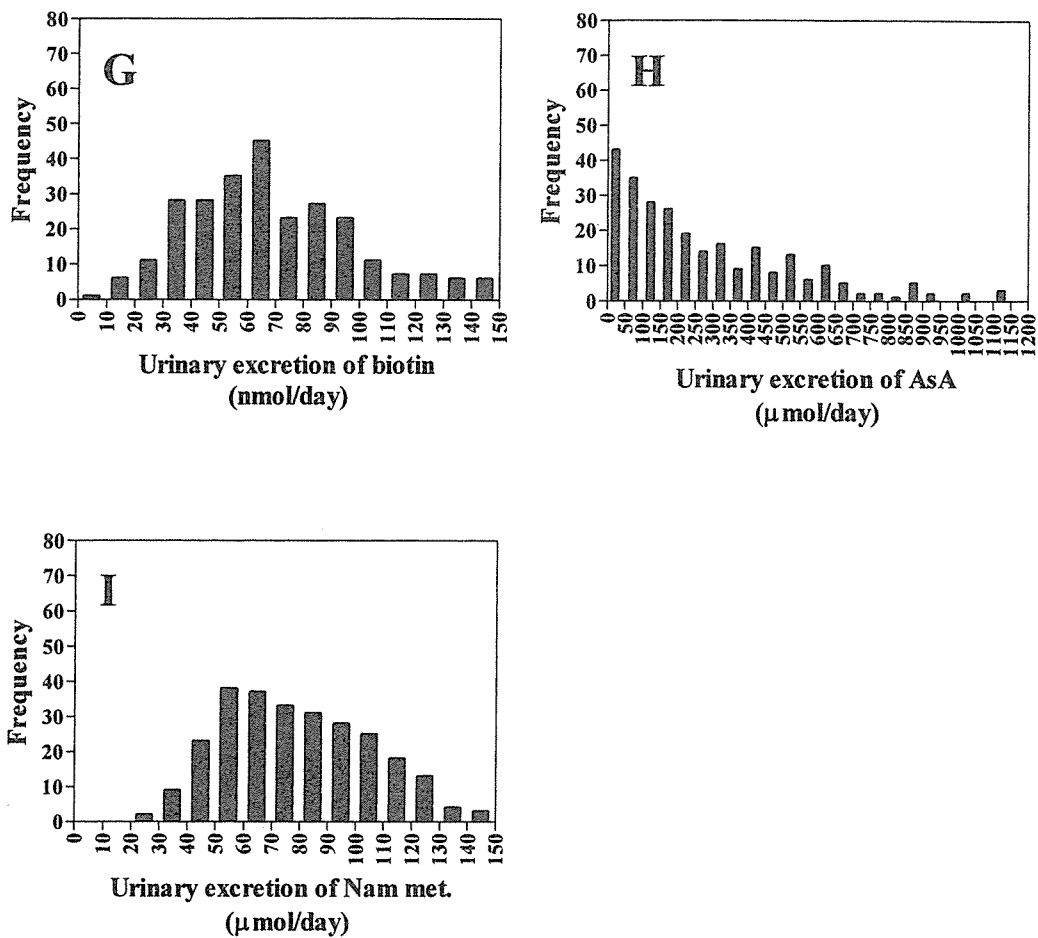


図9. 施設-4 女子学生の水溶性ビタミン尿中排泄量の度数分布図

A : ビタミン B₁ 尿中排泄量 (355 ± 248 nmol / day)

B : ビタミン B₂ 尿中排泄量 (296 ± 220 nmol / day)

C : ビタミン B₆ 尿中排泄量 (3.84 ± 1.30 μmol / day)

D : ビタミン B₁₂ 尿中排泄量 (125 ± 68.9 pmol / day)

E : パントテン酸尿中排泄量 (14.8 ± 4.40 μmol / day)

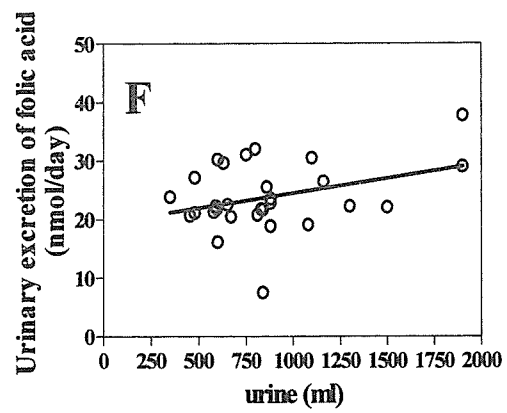
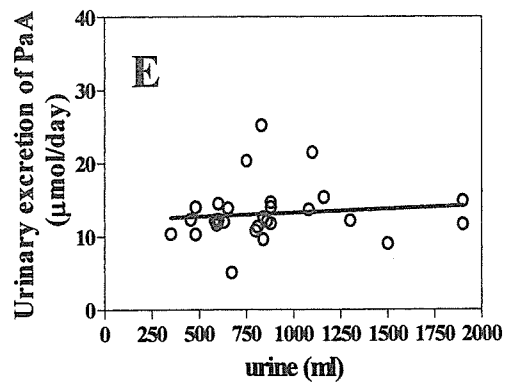
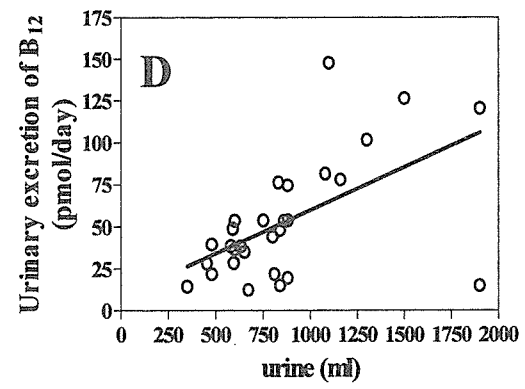
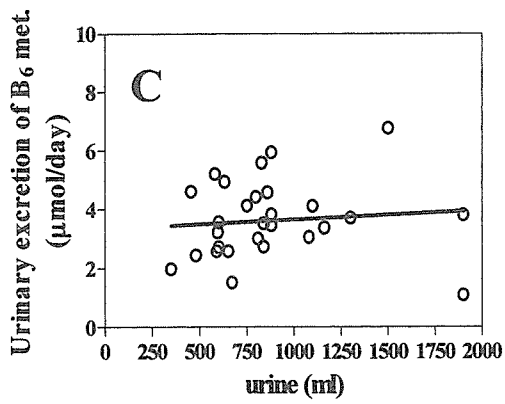
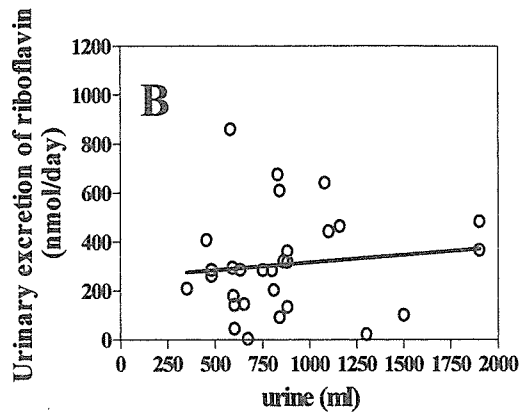
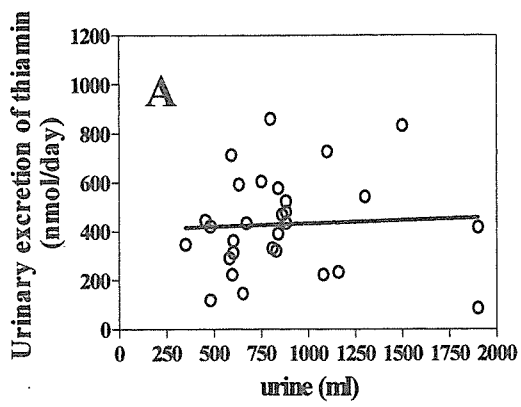
F : 葉酸尿中排泄量 (14.7 ± 5.49 nmol / day)

G : ビオチン尿中排泄量 (68.6 ± 29.7 nmol / day)

H : ビタミン C 尿中排泄量 (280 ± 249 μmol / day)

I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量 (78.7 ± 26.5 μmol / day)

値は平均値 ± 標準偏差 (n = 246) として示した.



次頁に続く

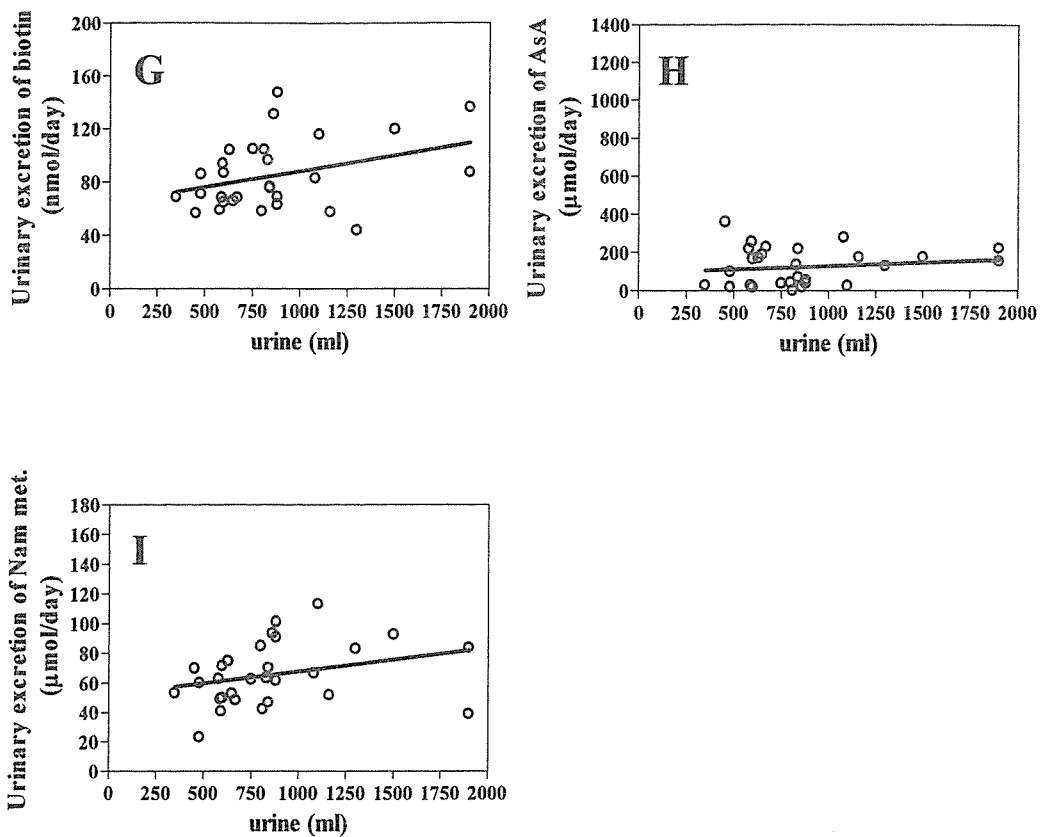


図 10. 施設-1 の女子大学生の水溶性ビタミン尿中排泄量と尿量との関係

A : ビタミン B₁ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.15122$, $p = 0.7919$)

B : ビタミン B₂ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.1152$, $p = 0.5520$)

C : ビタミン B₆ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.09288$, $p = 0.6318$)

D : ビタミン B₁₂ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.5591$, $p = 0.0016$)

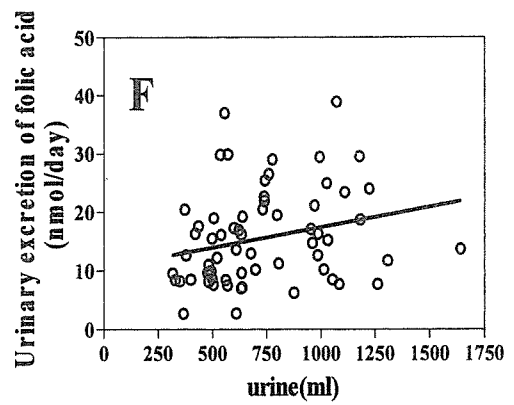
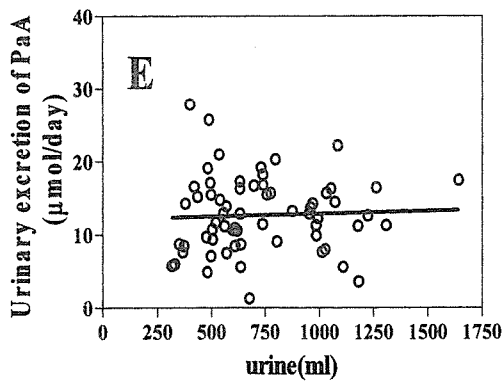
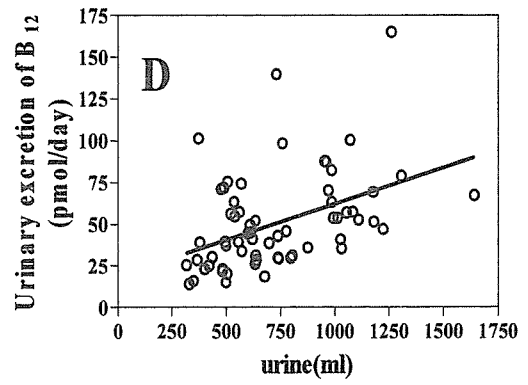
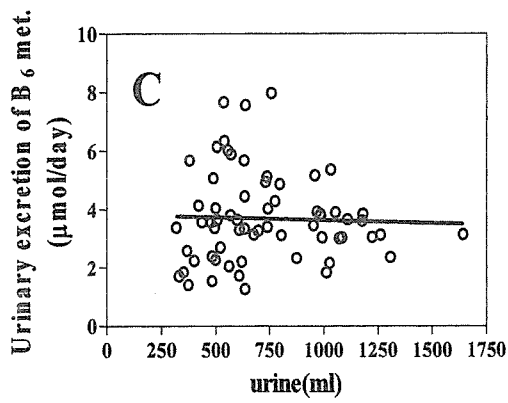
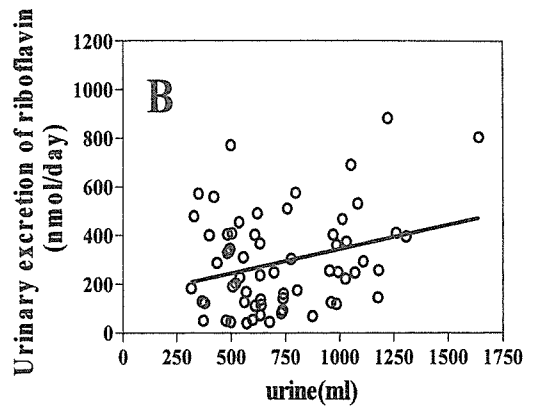
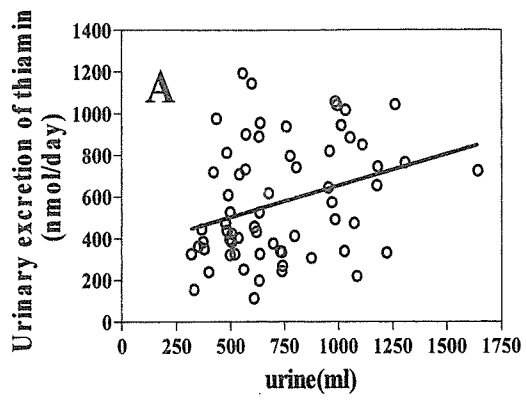
E : パントテン酸尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.1018$, $p = 0.5991$)

F : 葉酸尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.3412$, $p = 0.0701$)

G : ビオチン尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.3486$, $p = 0.0639$)

H : ビタミン C 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.1392$, $p = 0.4711$)

I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.2940$, $p = 0.1216$)



次頁に続く

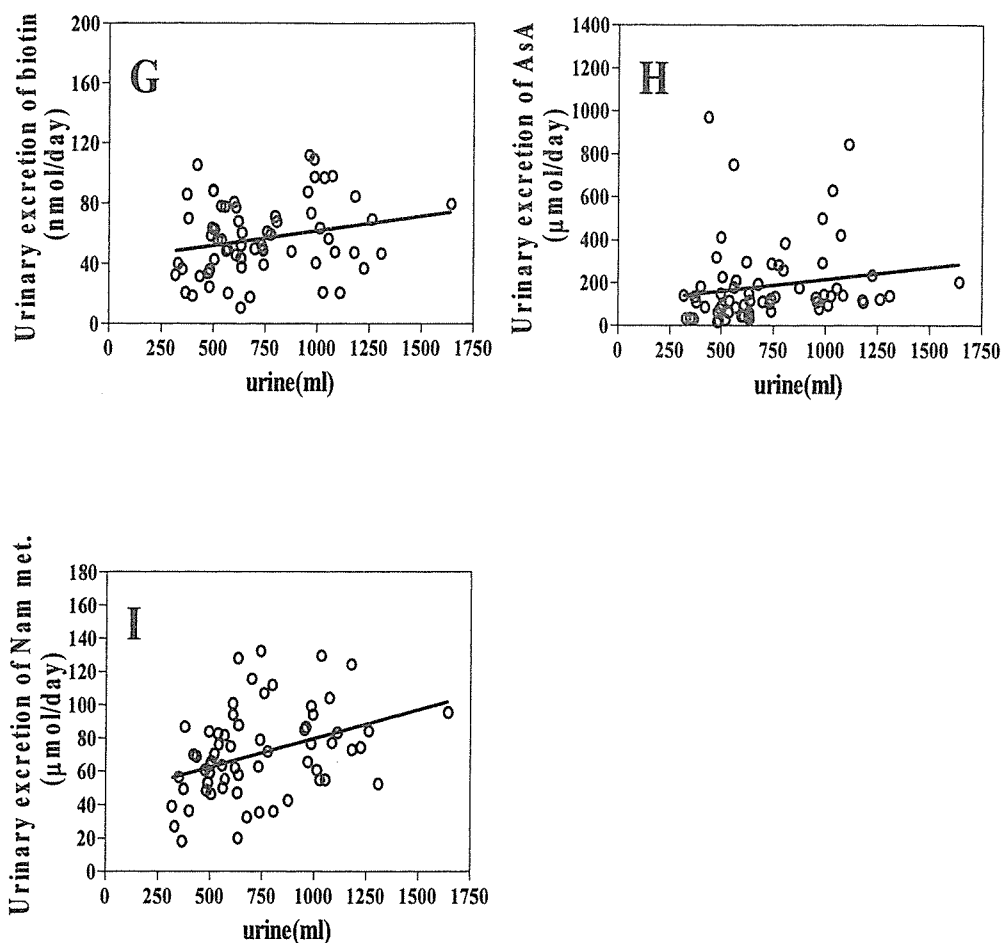


図 11. 施設-2 の女子学生の水溶性ビタミン尿中排泄量と尿量との関係

A : ビタミン B₁ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.3131$, $p = 0.0118$)

B : ビタミン B₂ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.2871$, $p = 0.0215$)

C : ビタミン B₆ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.03842$, $p = 0.7631$)

D : ビタミン B₁₂ 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.4342$, $p = 0.0003$)

E : パントテン酸尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.04267$, $p = 0.7378$)

F : 葉酸尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.2471$, $p = 0.0490$)

G : ビオチン尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.2257$, $p = 0.0729$)

H : ビタミン C 尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.1632$, $p = 0.1976$)

I : ナイアシン異化代謝産物尿中排泄量と尿量との関係 ($r = 0.3738$, $p = 0.0023$)