

Table 2
Urinary excretion of B-group vitamin expressed as per physical characteristics, urine volume, or urinary creatinine in Japanese female university students

	Urinary outputs per body height	Urinary outputs per body weight	Urinary outputs per BMI	Urinary outputs per BSA	Urinary outputs per urine volume	Urinary outputs per urinary creatinine
Thiamin	313 ± 238 (nmol/m)	9.73 ± 7.71 (nmol/kg)	24.4 ± 19.5 (nmol/[kg m ²])	315 ± 243 (nmol/m ²)	672 ± 622 (nmol/L)	490 ± 372 (nmol/g)
Riboflavin	225 ± 200 (nmol/m)	6.97 ± 6.14 (nmol/m)	17.5 ± 15.2 (nmol/[kg m ²])	227 ± 200 (nmol/m ²)	434 ± 363* (nmol/L)	354 ± 320* (nmol/g)
4-PIC	2.35 ± 0.95 (μmol/m)	72.4 ± 30.4† (nmol/kg)	181 ± 76* (nmol/[kg m ²])	2.36 ± 0.96† (μmol/m ²)	4.94 ± 2.62* (μmol/L)	3.73 ± 1.77 (μmol/g)
Vitamin B ₁₂	28.3 ± 15.5* (pmol/m)	0.870 ± 0.474* (pmol/kg)	2.19 ± 1.21 (pmol/kg m ²)	28.4 ± 15.4* (pmol/m ²)	52.7 ± 20.0* (pmol/L)	44.5 ± 24.4 (pmol/g)
Nam met	51.8 ± 21.0 (μmol/m)	1.59 ± 0.61* (μmol/kg)	3.99 ± 1.56 (μmol/kg m ²)	52.0 ± 20.4* (μmol/m ²)	111 ± 70* (μmol/L)	82.7 ± 37.5 (μmol/g)
Pantothenic acid	10.0 ± 3.6 (μmol/m)	308 ± 113 (nmol/kg)	771 ± 279 (nmol/[kg m ²])	10.0 ± 3.6 (μmol/m ²)	21.3 ± 11.3* (μmol/L)	15.9 ± 6.4 (μmol/g)
Folic acid	15.1 ± 6.2 (nmol/m)	468 ± 199 (pmol/kg)	1.17 ± 0.50 (nmol/[kg m ²])	15.2 ± 6.3 (nmol/m ²)	30.4 ± 12.5* (nmol/L)	23.9 ± 9.8* (nmol/g)
Biotin	41.4 ± 15.9 (nmol/m)	1.28 ± 0.50 (nmol/kg)	3.22 ± 1.31 (nmol/[kg m ²])	41.6 ± 16.0* (nmol/m ²)	87.5 ± 43.5* (nmol/L)	65.1 ± 25.2† (nmol/g)

Each number was expressed as mean ± SD, n = 186. The 24-hour urinary excretion of B-group vitamins was divided by body height (meters), body weight (kilograms), BMI (kilograms per square meter), BSA (square meters), urine volume (liters per day), and urinary creatinine (grams per day). Spearman correlation coefficients of each 24-hour urinary B-group vitamin outputs with physical characteristics, urine volume, or urinary creatinine were calculated. Nam met indicates nicotinamide metabolites.

Statistical differences were expressed as:

* $P < .05$.

† $P < .01$.

‡ $P < .001$.

Table 3
Urinary excretion of B-group vitamin expressed as per physical characteristics, urine volume, or urinary creatinine in Japanese elderly

	Urinary outputs per body height	Urinary outputs per body weight	Urinary outputs per BMI	Urinary outputs per BSA	Urinary outputs per urine volume	Urinary outputs per urinary creatinine
Thiamin	270 ± 273 (nmol/m)	7.85 ± 8.22 (nmol/kg)	18.8 ± 19.7 (nmol/[kg m ²])	266 ± 271 (nmol/m ²)	306 ± 349 (nmol/L)	531 ± 573 (nmol/g)
Riboflavin	351 ± 268 (nmol/m)	9.89 ± 7.81 (nmol/m)	23.5 ± 17.8 (nmol/[kg m ²])	341 ± 26 (nmol/m ²)	399 ± 385 (nmol/L)	706 ± 598 (nmol/g)
4-PIC	3.09 ± 1.50* (μmol/m)	86.6 ± 42.0 (nmol/kg)	210 ± 109 (nmol/[kg m ²])	2.99 ± 1.43 (μmol/m ²)	3.50 ± 2.07 (μmol/L)	5.87 ± 2.90 (μmol/g)
Vitamin B ₁₂	58.3 ± 32.3* (pmol/m)	1.65 ± 0.94 (pmol/kg)	3.98 ± 2.24 (pmol/kg m ²)	56.5 ± 31.5 (pmol/m ²)	61.3 ± 33.1† (pmol/L)	109 ± 66* (pmol/g)
Nam met	59.9 ± 27.8 (μmol/m)	1.67 ± 0.74* (μmol/kg)	4.03 ± 1.87* (μmol/kg m ²)	57.8 ± 26.0* (μmol/m ²)	68.4 ± 40.5 (μmol/L)	114 ± 54* (μmol/g)
Pantothenic acid	10.1 ± 4.1 (μmol/m)	286 ± 122 (nmol/kg)	683 ± 285 (nmol/[kg m ²])	9.83 ± 4.03 (μmol/m ²)	10.9 ± 4.7* (μmol/L)	19.1 ± 7.6* (μmol/g)
Folic acid	17.6 ± 10.3 (nmol/m)	499 ± 304 (pmol/kg)	1.18 ± 0.69 (nmol/[kg m ²])	17.1 ± 10.1 (nmol/m ²)	19.8 ± 12.5 (nmol/L)	34.6 ± 21.6 (nmol/g)
Biotin	45.3 ± 21.5 (nmol/m)	1.28 ± 0.63 (nmol/kg)	3.06 ± 1.47 (nmol/[kg m ²])	44.0 ± 21.0 (nmol/m ²)	50.0 ± 28.4 (nmol/L)	85.0 ± 38.0 (nmol/g)

Each number was expressed as mean ± SD, n = 104. The 24-hour urinary excretion of B-group vitamins was divided by body height (meters), body weight (kilograms), BMI (kilograms per square meter), BSA (square meters), urine volume (liters per day), and urinary creatinine (grams per day). Spearman correlation coefficients of each 24-hour urinary B-group vitamin outputs with physical characteristics, urine volume, or urinary creatinine were calculated. Nam met indicates nicotinamide metabolites.

Statistical differences were expressed as:

* $P < .05$.

† $P < .001$.

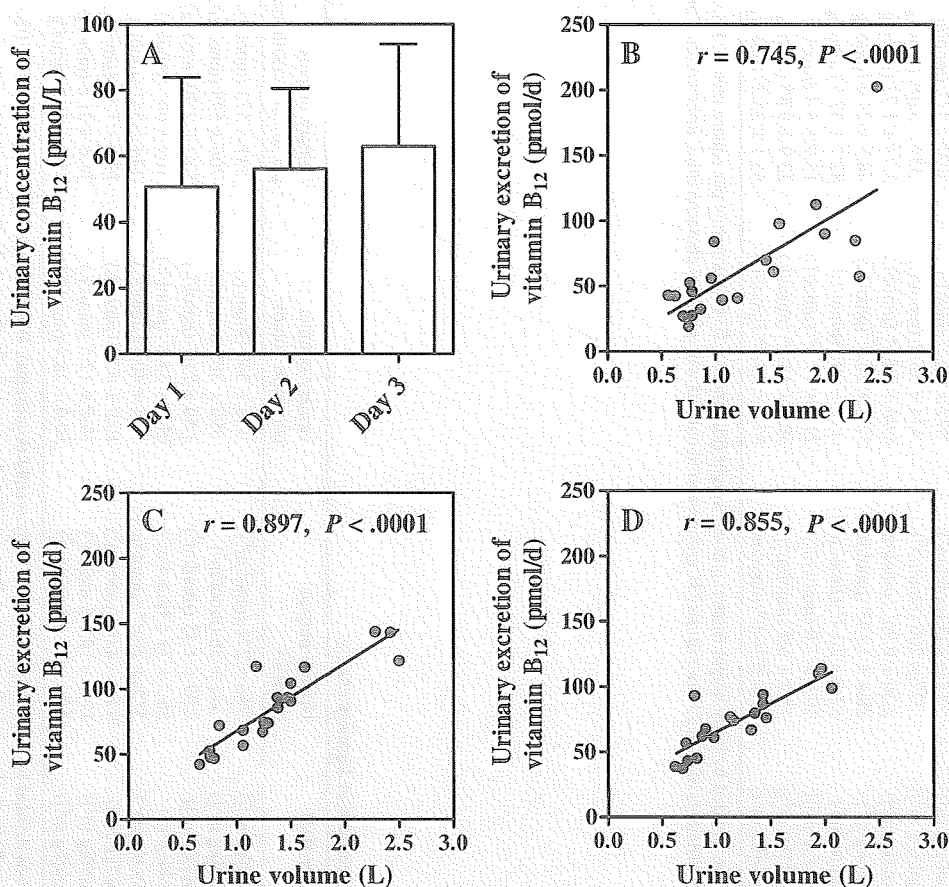


Fig. 1. Effect of administration of a pharmacologic dose of cyanocobalamin on urinary concentration of vitamin B₁₂ (A) and the correlations between urinary vitamin B₁₂ and urine volume on the day before cyanocobalamin intake (B), the day of intake (C) and the day after intake (D). Twenty Japanese adults consumed similar foods for 3 days and took a 1.5-mg cyanocobalamin tablet after breakfast on day 2. The 24-hour urine sample was collected for 3 successive days, and Pearson correlation coefficients between urinary vitamin B₁₂ and urine volume on each day were determined.

vitamin B₁₂ on the day before taking, the day of taking, and the day after taking vitamin B₁₂. Urinary concentration of vitamin B₁₂ did not change during the 3 days. Intake of 1.5 mg vitamin B₁₂ slightly increased urinary vitamin B₁₂ from 64.3 ± 41.4 to 85.6 ± 31.1 pmol/d ($P < .05$) and was 72.7 ± 23.0 pmol/d on the day after intake. Urinary excretion of vitamin B₁₂ was strongly correlated with urine volume on each day ($r = 0.745, P < .001$; $r = 0.897, P < .0001$; and $r = 0.855, P < .0001$, respectively) (Fig. 1B-D).

4. Discussion

To investigate if physical characteristics, urinary creatinine, and urine volume were related to the amount of B-group vitamins in urine, 24-hour urine samples were collected from 186 young women and 104 elderly Japanese subjects. Except for vitamin B₁₂, urinary B-group vitamins showed weak or no correlations with urine volume, urinary creatinine, and physical characteristics such as body height, body weight, BMI, and BSA. Urinary excretion of vitamin B₁₂ was strongly correlated with urine volume in young and

elderly subjects (Tables 2 and 3). To determine how urinary vitamin B₁₂ is affected by its intake and urine volume, subjects took a pharmacologic dose of cyanocobalamin. Urinary vitamin B₁₂ increased only 1.3-fold by its intake, and its concentration was not affected (Fig. 1A). Urinary vitamin B₁₂ was always strongly correlated with urine volume even on the day before, the day of, and the day after intake (Fig. 1B-D). These results clearly showed that urinary excretion of vitamin B₁₂ was dependent upon urine volume, but not on intake of vitamin B₁₂.

Recent studies suggest that urinary excretion of water-soluble vitamins is a useful marker to evaluate their intake. An investigation to assess urinary thiamin as a potential biomarker for thiamin intake reported a highly significant correlation between individuals' 30-day mean value of thiamin intake and mean excretion levels, and most subjects showed a high correlation between daily urinary thiamin and dietary thiamin [8]. Alcohol intake, carbohydrate intake, and physical activity were expected to affect vitamin B₁ metabolism [26-28]; but multiple regression models showed that only thiamin intake—not body weight, physical activity, alcohol intake, or carbohydrate intake—was the

predictor of thiamin excretion in the 30-day study [8]. These findings suggest that thiamin intake largely contributes to urinary thiamin content and that other factors affect it only slightly. Increasing the intake of water-soluble vitamins linearly increases their urinary excretion in a dose-dependent manner and is highly correlated with their excretion [7]. In the present study, urinary B-group vitamins except vitamin B₁₂ showed weak or no correlations with physical characteristics, urine volume, and urinary creatinine. These findings suggest that intake of B-group vitamin mostly affects their urinary excretion. Physical characteristics, urine volume, and urinary creatinine do not affect excretion of urinary B-group vitamins.

Vitamin B₁₂ is different from other B-group vitamins with respect to its mechanism of absorption and main excretion route [29]. Free vitamin B₁₂ binds with haptocorrin and gastric intrinsic factor (IF) in the stomach and the duodenum, respectively. This IF–vitamin B₁₂ complex attaches to the intestinal IF–vitamin B₁₂ receptor in the ileal mucosa, and vitamin B₁₂ enters to the enterocyte [30]. The excretion of IF is limited, so only 1% of the pharmacologic dose of vitamin B₁₂ is absorbed [31]. The main excretion route of vitamin B₁₂ is through the bile, as less than 10% of the total loss of vitamin B₁₂ from the body is through urine [29]. Several studies have investigated the change in urinary vitamin B₁₂ levels after administration of vitamin B₁₂. Oral administration of 1 mg of vitamin B₁₂ increases the level of urinary vitamin B₁₂ by 1.5- to 2.0-fold [32], whereas an intramuscular injection of 0.45 mg vitamin B₁₂ increases it by 2- to 3-fold [33]. In the present study, oral intake of 1.5 mg vitamin B₁₂ (500-fold higher than daily intake) increased the level of urinary vitamin B₁₂ by 1.3-fold. These results suggest that the change in the level of urinary vitamin B₁₂ is too small to evaluate intake of vitamin B₁₂ and that measurement of the level of urinary vitamin B₁₂ is an inadequate assessment of vitamin B₁₂ intake.

Urine volume was not correlated with urinary B-group vitamin content (except for vitamin B₁₂). This suggests that urine volume does not affect urinary excretion of B-group vitamins. Although most urinary B-group vitamins were correlated with urine volume in free-living young women, their correlations were weak ($r < .2$). The level of urinary vitamin B₁₂ was strongly correlated with urine volume in all investigations and experiments. The mean urinary vitamin B₁₂ concentration was 52.7 ± 20.0 and 61.3 ± 33.1 pmol/L in young female and elderly subjects, respectively, and 51.1 ± 18.4 , 64.8 ± 11.3 , and 64.0 ± 15.0 pmol/L the day before, the day of, and the day after vitamin B₁₂ intake, respectively. These results suggest that urinary vitamin B₁₂ concentration is always constant at about 60 pmol/L. Vitamin B₁₂ released from the liver or absorbed from the ileum binds to carrier protein transcobalamin (TC) in serum [34]. The TC–vitamin B₁₂ complex is filtered in the glomeruli, and the proximal convoluted tubule reabsorbs this complex via a receptor-mediated system [30]. Megalin is an essential receptor for reabsorption of the TC–vitamin B₁₂ complex in the proximal tubule because megalin-deficient mice showed 4-fold higher

urinary excretion of vitamin B₁₂ and 28-fold higher renal vitamin B₁₂ clearance compared with control mice [35]. Megalin binds to the TC–vitamin B₁₂ complex with an estimated affinity (K_d) of about 183 nmol/L [36]. This high affinity may explain why urinary loss of vitamin B₁₂ is very low. Little is known about how water regulation, mediated by regulatory factors such as aquaporin, vasopressin, and angiotensin, is linked to reabsorption of vitamin B₁₂.

The major limitation of this study was that we were unable to assess the true nutrition status of the subjects. In the present study, we determined no more than the correlations between urinary output of each B-group vitamin and physical characteristics, urine volume, and urinary creatinine in the free-living subjects and did not investigate B-group vitamin intakes in the subjects. The factors affecting urinary excretion of B-group vitamins may involve the intestinal mucosal interaction, absorption, in-blood transport, tissue enzyme degradation, host nutritional status, and a diversity of physiologic conditions such as serum pH, kidney function, protein interference, and fat codigestion. To clarify the problems mentioned above, subjects would be required to stay in an institution under strictly controlled conditions such as diet, physical activity, and lifestyle. Although the present investigation could not assess the degree of contribution to urinary B-vitamins by physical characteristics and urine volume, we could determine that urinary vitamin B₁₂ was dependent upon urine volume. This finding was clearly confirmed by the present intervention study showing a strong correlation between urinary vitamin B₁₂ and urine volume. Another limitation is that the subjects were restricted to female dietetic students and the elderly. Our subjects may have been highly health conscious and wellness motivated. Thus, our results may not be extrapolated to general populations but only to populations with similar characteristics.

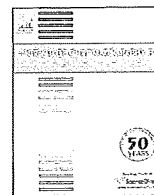
We evaluated B-group vitamin intake from urinary levels of B-group vitamins and their metabolites in healthy subjects. The findings of the present study showed that urinary excretion of B-group vitamins, except for vitamin B₁₂, was not affected by physical characteristics, urine volume, and urinary creatinine in healthy subjects. Only urinary excretion of vitamin B₁₂ was affected by urine volume, and oral administration of pharmacologic doses of vitamin B₁₂ did not change levels of urinary vitamin B₁₂. These results suggest that the parameters assessed in the present study cannot be used to estimate B-group vitamin intake from urinary B-group vitamins and that urinary vitamin B₁₂ is not a marker to estimate its intake. Further studies may contribute to the establishment and effective use of these biomarkers for assessment of water-soluble vitamin nutrition.

Acknowledgment

This investigation was supported by The Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. We are deeply indebted to the subjects for their willingness to participate in this study.

References

- [1] Potischman N, Freudenheim JL. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview. *J Nutr* 2003;133:873S–4S.
- [2] Bingham SA. Urine nitrogen as a biomarker for the validation of dietary protein intake. *J Nutr* 2003;133:921S–4S.
- [3] Tasevska N, Runswick SA, Bingham SA. Urinary potassium is as reliable as urinary nitrogen for use as a recovery biomarker in dietary studies of free living individuals. *J Nutr* 2006;136:1334–40.
- [4] Tasevska N, Runswick SA, McTaggart A, Bingham SA. Urinary sucrose and fructose as biomarkers for sugar consumption. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1287–94.
- [5] Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington DC: National Academy Press; 1998.
- [6] The Ministry of Health, Labour, and Welfare. Dietary reference intakes for Japanese, 2005; 2004. Tokyo.
- [7] Fukuwatari T, Shibata K. Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as biomarkers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008;54:223–9.
- [8] Tasevska N, Runswick SA, McTaggart A, Bingham SA. Twenty-four-hour urinary thiamine as a biomarker for the assessment of thiamin intake. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:1139–47.
- [9] Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, et al. Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* 2005;51:319–28.
- [10] Ihara H, Matsumoto T, Kakinoki T, Shino Y, Hashimoto R, Hashizume N. Estimation of vitamin B₁ excretion in 24-hr urine by assay of first-morning urine. *J Clin Lab Anal* 2008;22:291–4.
- [11] Rieck J, Halkin H, Almog S, Seligman H, Lubetsky A, Olchovsky D, et al. Urinary loss of thiamine is increased by low doses of furosemide in healthy volunteers. *J Lab Clin Med* 1999;134:238–43.
- [12] Bingham SA, Cassidy A, Cole TJ, Welch A, Runswick SA, Black AE, et al. Validation of weighed records and other methods of dietary assessment using the 24 h urine nitrogen technique and other biological markers. *Br J Nutr* 1995;73:531–50.
- [13] Gerchman F, Tong J, Utzschneider KM, Zraika S, Udayasankar J, McNeely MJ, et al. Body mass index is associated with increased creatinine clearance by a mechanism independent of body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, doi:10.1210/jc.2008-2508.
- [14] Stamler J, Elliott P, Dennis B, Dyer AR, Kesteloot H, Liu K, et al, INTERMAP Research Group. INTERMAP: background, aims, design, methods, and descriptive statistics (nondietary). *J Hum Hypertens* 2003;17:591–608.
- [15] Pullman ME, Colowick SP. Preparation of 2- and 6-pyridones of N¹-methylnicotinamide. *J Biol Chem* 1954;206:121–7.
- [16] Shibata K, Kawada T, Iwai K. Simultaneous micro-determination of nicotinamide and its major metabolites, N¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and N¹-methyl-3-pyridone-4-carboxamide, by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988;424:23–8.
- [17] Fukuwatari T, Suzuura C, Sasaki R, Shibata K. Action site of bisphenol A as metabolic disruptor lies in the tryptophan-nicotinamide conversion pathway. *J Food Hyg Soc Japan* 2004;45:231–8.
- [18] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. New metabolites of riboflavin appear in human urine. *J Biol Chem* 1983;258:5623–8.
- [19] Gregory III JF, Kirk JR. Determination of urinary 4-pyridoxic acid using high performance liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 1979;32:879–83.
- [20] Watanabe F, Katsura H, Takenaka S, Fujita T, Abe K, Tamura Y, et al. Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *J Agric Food Chem* 1999;47:4736–41.
- [21] Shibata K. Ultramicro-determination of N¹-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *Vitamins* 1987;61:599–604.
- [22] Skeggs HR, Wright LD. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. *J Biol Chem* 1944;156:21–6.
- [23] Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis. Optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. *J Nutr Sci Vitaminol* 1998;44:361–70.
- [24] Fukui T, Iinuma K, Oizumi J, Izumi Y. Agar plate method using *Lactobacillus plantarum* for biotin determination in serum and urine. *J Nutr Sci Vitaminol* 1994;40:491–8.
- [25] Slot C. Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffe reaction method. *Scand J Clin Lab Invest* 1965;17:381–7.
- [26] Hoyumpa AM, Nichols SG, Wilson FA, Schenker S. Effect of ethanol on intestinal (Na, K) ATPase and intestinal thiamin transport in rats. *J Lab Clin Med* 1977;90:1086–95.
- [27] Manore MM. Effect of physical activity on thiamin, riboflavin, and vitamin B-6 requirements. *Am J Clin Nutr* 2000;72:598S–606S.
- [28] Elmaddfa I, Majchrzak D, Rust P, Genser D. The thiamin status of adult humans depends on carbohydrate intake. *Int J Vitam Nutr Res* 2001;71:217–21.
- [29] Shinton NK. Vitamin B₁₂ and folate metabolism. *Br Med J* 1972;1:556–9.
- [30] Birn H. The kidney in vitamin B₁₂ and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F22–36.
- [31] Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B₁₂ without intrinsic factor. *Acta Med Scand* 1968;184:247–58.
- [32] Pitney WR, Beard MF. Serum and urine concentrations of vitamin B₁₂ following oral administration of the vitamin. *Am J Clin Nutr* 1954;2:89–96.
- [33] Mehta BM, Rege DV, Satoskar RS. Serum vitamin B₁₂ and folic acid activity in lactovegetarian and nonvegetarian health adult Indians. *Am J Clin Nutr* 1964;15:77–84.
- [34] Allen RH. Human vitamin B₁₂ transport proteins. *Prog Hematol* 1975;9:57–84.
- [35] Birn H, Willnow TE, Nielsen R, Norden AG, Bonsch C, Moestrup SK, et al. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption and accumulation of transcobalamin-B₁₂. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F408–16.
- [36] Moestrup SK, Birn H, Fischer PB, Petersen CM, Verroust PJ, Sim RB, et al. Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B₁₂ complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B₁₂ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:8612–7.



Short communication

Fluorometric determination of pantothenic acid in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with post-column derivatization

Kei Takahashi, Tsutomu Fukuwatari*, Katsumi Shibata

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka, Hikone, Shiga 522-8533, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2009

Accepted 28 May 2009

Available online 6 June 2009

Keywords:

Pantothenic acid

Ion-pair HPLC

Vitamin

Human urine

Fluorometric

Post-column derivatization

ABSTRACT

We describe here a method for the determination of pantothenic acid, vitamin B₅, in human urine by isocratic reversed-phase ion-pair HPLC with post-column derivatization. Pantothenic acid in urine was separated using a Tosoh ODS-80Ts (4.6 i.d. × 250 mm) column with phosphate–sodium hydroxide buffer (pH 7.0) containing dodecyltrimethylammonium chloride. Following the isolation of pantothenic acid it was decomposed to pantoic acid and β-alanine by alkali treatment. The product β-alanine was post-derivatized to the fluorescent 1-alkylthio-2-alkylisoindole with orthophthalaldehyde in the presence of 3-mercaptopropionic acid. In the proposed method, a urine sample can be directly injected into a HPLC system without any pre-clean up treatment. The limit of detection was 3 pmol (ca. 650 pg) per 20 μL of urine at a signal-to-noise ratio of 5:1 and the limit of quantification was 5 pmol (ca. 1000 pg) per 20 μL of urine, which was sufficiently sensitive for the determination of pantothenic acid in human urine. The total time required for the analysis was ca. 25 min. The proposed method can be used to assess the pantothenic acid content of human urine as an alternative to the standard microbiassay for pantothenic acid.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recent studies have shown that the analysis of urinary compounds can provide a great deal of useful nutritional information. For example, urinary excretion of protein, potassium and sugar [1–3] can be used as biomarkers to estimate the intake of the respective nutrients.

Pantothenic acid (PaA) is a water-soluble vitamin, and there are reports of a correlation between urinary excretion and intake [4]. Urinary excretion of PaA is therefore a suitable surrogate indicator of PaA intake. Several methods for the measurements of PaA have been reported. The most reliable and common method is a microbiassay which uses *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 [5]. The merits of the assay include its sensitivity and the fact that expensive instruments and reagents are not required. The disadvantage of the microbiassay is that it requires specialist knowledge and technique. Alternative chemical assay methods have therefore been developed. For example, the use of radioimmunoassay [6,7] and indirect enzyme immunoassay [8–10] have been reported. Radioisotopes and scintillation counting are required for the former, and non-commercially available antisera are needed for the latter. Methods using gas chromatography–mass spectrometry with multiple ion detection [11]; liquid chromatography–mass spectrometry

[12–14]; and liquid chromatography–tandem mass spectrometry [15] have also been reported. Whilst these methods may be associated with high precision, the analytical systems required are expensive and difficult to maintain.

High-performance liquid chromatography (HPLC) assays using ultraviolet (UV) [16–19] or fluorometric detection [20,21] to measure PaA have been reported. The assay using UV detection cannot be applied to urinary PaA because the PaA molecule absorbs very weakly in the UV region. Although the fluorometric determination of PaA as reported by Pakin et al. [21] would be suitable for the rapid determination of the compound in urine, the sample requires pre-treatment and the HPLC separation can be problematic. In this assay, the sample must be purified and the pH adjusted several times which leads to dilution of the sample. We applied this method to the measurement of PaA in human urine; however, we were unable to detect PaA in some samples because of its low concentration in human urine.

In this study, we describe a novel assay for measuring PaA in urine by isocratic reversed-phase ion-pair HPLC with post-column derivatization.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Calcium pantothenate, orthophthalaldehyde (OPA), 3-mercaptopropionic acid (3-MPA), sodium hydroxide, potassium

* Corresponding author. Fax: +81 749 28 8499.

E-mail address: fukkie@shc.usp.ac.jp (T. Fukuwatari).

Table 1
Basal data for the new HPLC method for detection of PaA.

Auto-sampler	SIL-10AD _{VP} (SHIMADZU)
Pump-1	L-2130 (HITACHI)
Pump-2	L-2130 (HITACHI)
Pump-3	L-2130 (HITACHI)
Column oven-1	L-2350 (HITACHI)
Column oven-2	655A-52 (HITACHI)
Fluorescence detector	RF-10A _{XL} (SHIMADZU)
Data processor	C-R8A (SHIMADZU)
Column	Tosoh ODS-80Ts (4.6 i.d. × 250 mm)
Length of reactor tube	60 m (PTFE tube, 0.5 mm i.d.)
Temperature (column oven-1)	40 °C
Temperature (column oven-2)	100 °C
Flow-speed 1 (pump-1)	1.0 mL min ⁻¹
Flow-speed 2 (pump-2)	0.5 mL min ⁻¹
Flow-speed 3 (pump-3)	0.5 mL min ⁻¹
Excitation/emission wavelength	345 nm/455 nm
Mobile phase	60 mM KH ₂ PO ₄ -NaOH buffer (pH7.0) containing 5 mM DTMA and 5% acetonitrile (v/v)
Solution-1	600 mM NaOH
Solution-2	10 mM OPA and 16 mM 3-MPA

dihydrogenphosphate and acetonitrile were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Limited (Osaka, Japan). Tetraethylammonium chloride (TEA), tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBA), hexadecyltrimethylammonium chloride (HDTMA) and tetraheptylammonium bromide (THEPA) were also purchased from Wako. Dodecyltrimethylammonium chloride (DTMA) was supplied by Tokyo Kasei Kogyo Company, Limited (Tokyo, Japan) and tetrahexylammonium hydrogen sulfate (THEXA) and tetraoctylammonium bromide (TOA) were obtained from Fluka (NJ, USA).

2.2. Chromatographic analysis

The instrumentation and the chromatographic condition are shown in Table 1 and Fig. 1.

Separation of PaA in urine was carried out using a Tosoh ODS-80Ts (4.6 i.d. × 250 mm) column (Tokyo, Japan) with pump-1 and column oven-1 (Fig. 1). The mobile phase consisted of 60 mM KH₂PO₄-NaOH buffer (pH 7.0) containing 5 mM ion-pair reagent and 5% acetonitrile; a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ was used and the column temperature was maintained at 40 °C. Seven ion-pair reagents were compared: TEA, TBA, DTMA, HDTMA, THA, THEPA and TOA.

After the separation was complete, the column effluent was subjected to post-column hot alkaline hydrolysis using NaOH (solution-1), which was delivered via pump-2 at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ through a T-connector attached to the polytetrafluoroethylene reactor tube (0.5 mm i.d.) in column oven-2 which was maintained at 100 °C. The effect of various NaOH concentrations (300, 600, 900 and 1500 mM) and reactor tube lengths (40 and 65 m) was compared.

After hot alkaline hydrolysis, an aqueous solution containing 10 mM OPA and 16 mM 3-MPA (solution-2; Fig. 1) was delivered at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ via pump-3 through a T-connector to the hydrolyzed effluent to effect post-column derivatization.

2.3. Preparation

Stock solutions of β-alanine and PaA were made up to 1 mM with ultrapure water and stored at -20 °C. Working standard solutions were diluted from the stock solutions to produce a series of concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 and 100 μM); 20 μL of each concentration was then injected into the HPLC system.

Urine collected from three healthy volunteers was used for validation of the method. The samples were compared with the optimal

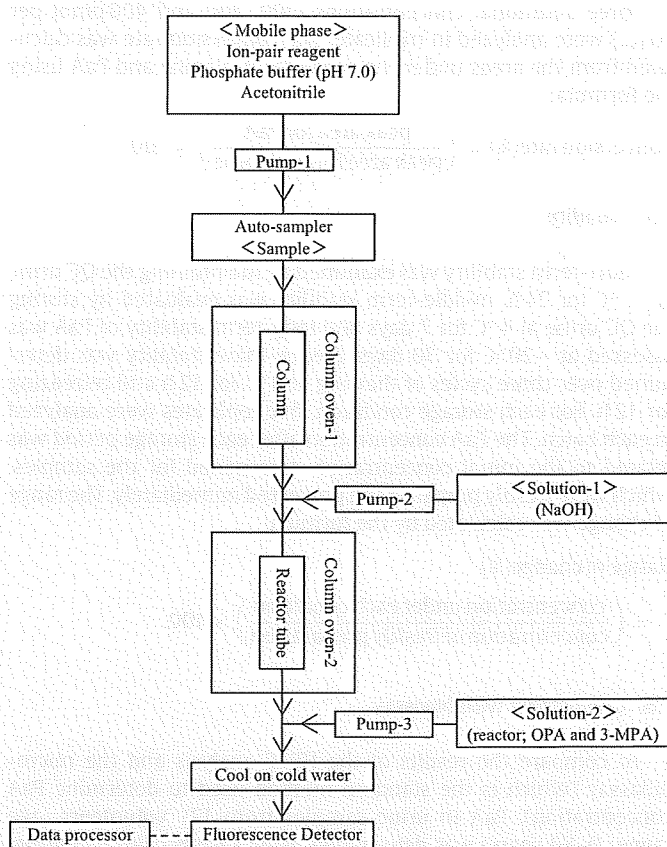


Fig. 1. Determination of PaA in urine (schematic).

basal conditions in the HPLC system which served as the quality control (QC) sample. The results obtained from the HPLC and microbioassay of the 24 h urine samples were compared. The QC and 24 h urine samples were stored at -20 °C and thawed when needed. An aliquot of the urine samples (1.5 mL) was centrifuged at 15,000 × g for 10 min at room temperature. The supernatant obtained was filtered through a micro-filter (pore size, 0.45 μm; Millipore, Bedford, USA) and the filtrate (20 μL) injected directly into the HPLC system.

2.4. Assay validation

The within-run precision was calculated by analyzing five replicates of the QC urine on the same day. Between-run precision was determined by triplicate analysis of QC urine on three separate occasions and the value of each was calculated by analyzing five replicates. The coefficient of variation (CV) was used to measure the precision, where:

$$CV(\%) = \left\{ \frac{\text{standard deviation (SD)}}{\text{mean}} \right\} \times 100.$$

Within-run accuracy was measured in different experiments to calculate the precision, and evaluated in the same experiment to ascertain recovery. Accuracy was expressed as relative error (RE) and determined by the equation:

$$RE(\%) = \left\{ \frac{\text{observed concentration} - \text{added concentration}}{\text{added concentration}} \right\} \times 100.$$

The precision and accuracy needed to be within ±10%. Recovery was calculated by the formula:

$$\text{Recovery}(\%) = \left(\frac{\text{observed concentration}}{\text{added concentration}} \right) \times 100.$$

Three additional concentrations (100, 200 and 400 pmol per 20 μ L) were analyzed in triplicate. The conversion rate was calculated from the areas under the peaks for β -alanine and PaA using the formula:

$$\text{Conversion rate(\%)} = \left(\frac{\text{peak area for PaA}}{\text{peak area for } \beta\text{-alanine}} \right) \times 100.$$

2.5. Stability

Short-term stability was examined by maintaining the QC urine at 37 °C for 24 h, middle-term stability was evaluated by storing the QC urine at 4 °C for 7 days and long-term stability of PaA was assessed at –20 °C for 30 days. Freeze–thaw stability was determined over three cycles of thawing at 4 °C for 12 h and refreezing for 12 h. For each storage condition, five replicates were analyzed in each batch. The PaA concentration after each storage period was related to the initial concentration determined for the samples, which were freshly prepared and processed immediately. The range of change was calculated by the formula:

Range of change(%)

$$= \left(\frac{\text{concentration under each condition}}{\text{concentration of freshly preparation}} \right) \times 100.$$

2.6. Comparison with bioassay

To compare the results of the HPLC analysis and the micro-bioassay (which is the standard method used to determine PaA concentration), PaA in urine samples from 121 volunteers (age range: 9–80 years) was determined using *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014, American Type Culture Collection, USA) as reported by Wright and Skeggs [5].

3. Results and discussion

3.1. HPLC conditions

To determine the PaA concentration in human urine, we modified the fluorometric HPLC method reported by Blanco et al. [20] and Pakin et al. [21] (Table 1 and Fig. 1). The first step is the separation of PaA; the second step is the decomposition of PaA into pantoic acid and β -alanine; and the final step is the reaction between β -alanine, OPA and 3-MPA. The product is 1-alkylthio-2-alkylisoindole, which can be detected at an excitation wavelength of 345 nm and an emission wavelength of 455 nm.

We used 60 mM KH_2PO_4 –NaOH buffer (pH 7.0) containing 5% acetonitrile to separate PaA from other compounds in urine using an isocratic-flow system. We used pump-1, column oven-1 and a Tosoh ODS-80Ts column for the separation phase; pump-2, column oven-2 and a PTFE tube (0.5 mm i.d.) as the reactor tube for the alkaline hydrolysis of PaA at an elevated temperature; and pump-3 for the derivatization of β -alanine produced from the decomposition of PaA, with OPA and 3-MPA. The concentrations of the reagents OPA and 3-MPA used in our experiment were those recommended in the literature [20,21].

3.2. Experiment on optimization conditions for PaA measurement in urine without pre-clean up treatment

3.2.1. Derivatization

Although Pakin's system uses a mixture of OPA, 3-MPA and NaOH [21], OPA was found to be unstable to heat and alkali. We investigated whether the mixed solution of NaOH, OPA and 3-MPA was stable after 16 h. The non-mixed solution system was solution-1 (600 mM NaOH) and solution-2 (10 mM OPA and 16 mM 3-MPA).

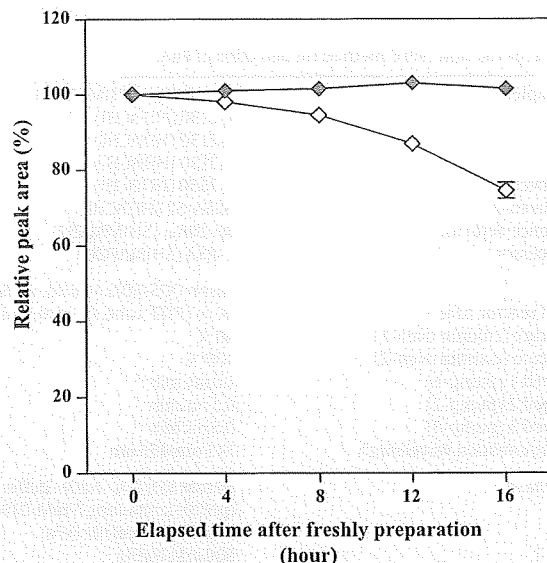


Fig. 2. Effect of using mixed solutions for post-derivatization on the peak area of β -alanine, and comparison of the stability using non-mixed solution and mixed solution. Values are based on the peak area measured at 0 h which is shown as 100%. The results are expressed as mean \pm SD ($n = 5$): (\diamond) mixed solution of 600 mM NaOH, 5 mM OPA and 8 mM 3-MPA; (\blacklozenge) non-mixed solution, solution-1 was 600 mM NaOH, and solution-2 was 10 mM OPA and 16 mM 3-MPA.

The flow rate of both solutions (solution-1 and solution-2) was 0.5 mL min^{-1} . The mixed solution comprised 600 mM NaOH, 5 mM OPA and 8 mM 3-MPA, and the flow rate was set at 1.0 mL min^{-1} (Fig. 2). Reproducibility was based on each peak area of PaA at 0 h after solution preparation, and was shown to be 100%. In this study, the wide baseline fluctuations did not result from using two pumping devices. The peak area at 0 h for the mixed solution and non-mixed solution did not differ. The peak area produced with the mixed solution gradually decreased to 70% at 16 h after solution preparation. The non-mixed solution was reproducible for 16 h, and was used for subsequent study.

3.2.2. Selection of ion-pair reagents

We compared the representative chromatograms without ion-pair reagents and with seven types of ion-pair reagents. The mobile phase without ion-pair reagent failed to separate PaA from other compounds in urine. The ion-pair reagent (5 mM) was added to the mobile phase. HDTA, THEPA and TOA did not dissolve in mobile phase but the other reagents were found to be soluble, and the QC urine was analyzed using the various mobile phases (Fig. 3). Good separation was obtained with the mobile phases containing TBA, THEXA and DTMA although TBA and THEXA produced tailing. We therefore selected DTMA as the ion-pair reagent. These results did not change even when the concentration was increased to 10 mM.

3.2.3. Effect of NaOH concentration

The alkaline hydrolysis of PaA was markedly affected by the concentration of NaOH and the concentration recommended in the literature [21] did not produce adequate hydrolysis. We therefore examined the optimal concentration of NaOH required to achieve hot alkaline hydrolysis. We compared the peak of β -alanine derived from PaA using 300, 600, 900 and 1500 mM NaOH. The peak area increased when the NaOH concentration increased from 300 to 600 mM. However, the increase in NaOH concentration from 600 to 900 mM, and from 900 to 1500 mM caused the peak area for derived PaA to decrease. We therefore selected 600 mM NaOH as the hydrolyzing solution because the area for derived PaA was the largest.

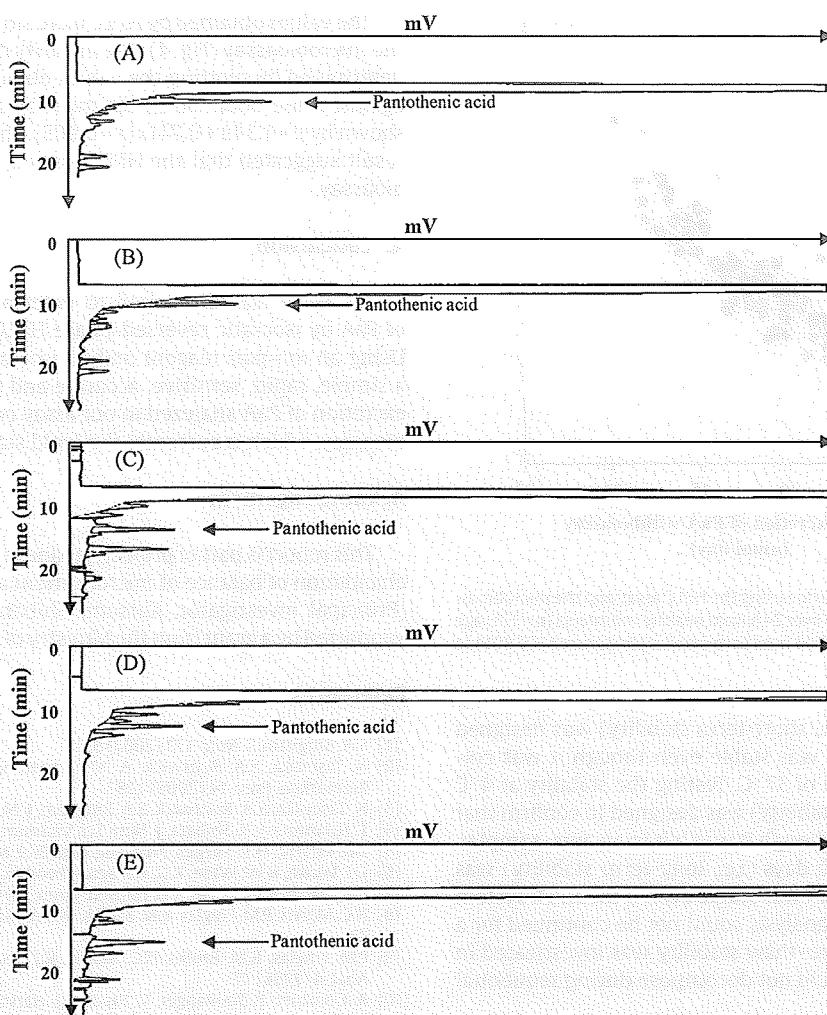


Fig. 3. Effect of the ion-pair reagent on the separation of PaA in urine. Chromatograms showing the influence of various ion-pair reagents on the separation of PaA: chromatogram: (A) no ion-pair reagent; (B) TEA; (C) TBA; (D) THEXA; (E) DTMA. A 20- μ L sample of QC urine was injected into the HPLC system. The mobile phase consisted of 60 mM phosphate-NaOH buffer (pH 7.0) containing 5 mM of each ion-pair reagent and 5% acetonitrile. Solution-1 was 600 mM NaOH. Solution-2 consisted of 10 mM OPA and 16 mM 3-MPA.

3.2.4. Effect of the length of the reactor module on hydrolysis with hot alkali

We found that the optimal concentration of NaOH for hydrolysis treatment was 600 mM, but the conversion rate (β -alanine from PaA/ β -alanine) was only 58%. We could not obtain a satisfactory conversion rate of PaA to β -alanine. Hot alkaline hydrolysis was markedly affected by not only NaOH concentration, but also by temperature and time. The temperature had been set at 100 °C, and could not be set higher. We therefore tried to use a longer reactor tube to improve the conversion rate of β -alanine.

When the reactor tube was extended from 40 to 65 m, the peak area derived from PaA increased. The increase in the conversion rate was from 58% to 95%. Lengthening the tube by 25 m extended the hydrolysis time by 3.5 min, and the time to hydrolysis was extended from 5 to 8.5 min. The optimal length of reactor tube was selected to be 65 m because the conversion rate obtained was satisfactory. The optimal HPLC conditions are summarized in Table 1.

3.3. Method validation

3.3.1. Linearity of calibration curve and limit of quantification

The linearity of the calibration curve was determined by plotting the peak area (y) of PaA against the standard PaA concentration (x). The correlation coefficient was >0.99 , confirming that the calibra-

tion curve was linear over the concentration range 5–1000 pmol per 20 μ L for the PaA standard. The typical standard curve can be represented by $y = 11370 + 2048x$ ($r = 0.997$). QC urine could be detected at 3 pmol (658 pg) per 20 μ L at a signal-to-noise ratio of 5:1, and therefore, the limit of detection was 3 pmol (658 pg) per 20 μ L of urine. The limit of quantification was 5 pmol (1096 pg) per 20 μ L of urine, which was sufficiently sensitive for the determination of PaA in human urine.

3.3.2. Accuracy and precision

The CV of the within- and between-run precision was 0.63% and 0.79%, respectively. The accuracies as shown by RE were 1.1%, -6.1% and -3.6% at concentrations of 100, 200 and 400 pmol per 20 μ L, respectively. These data indicated that the assay was reproducible, accurate and reliable.

3.3.3. Recovery

We added 100, 200 and 400 pmol per injection of standard PaA to urine samples, and the recoveries were $101 \pm 3\%$, $94 \pm 1\%$ and $96 \pm 3\%$, respectively.

3.3.4. Stability

We had previously examined the stability of PaA in urine by bioassay, but we evaluated it again in this study. The stability of

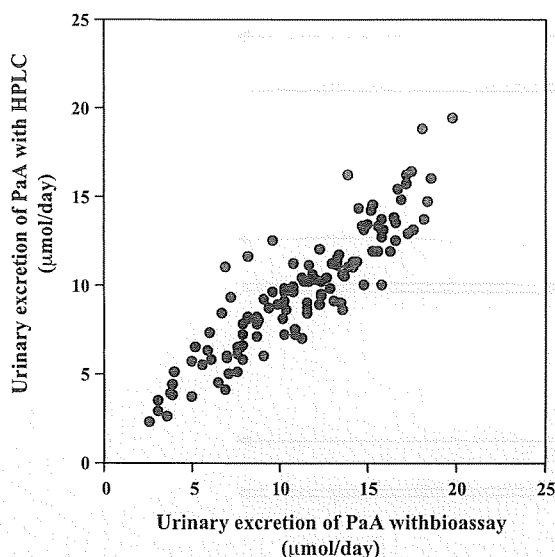


Fig. 4. Comparison of PaA in human urine using the HPLC assay and the microbioassay. The urine samples were collected over 24 h from healthy volunteers ($n = 121$; age range: 9–80 years). The bioassay method used *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 to determine the level of PaA.

QC urine at 37 °C for 24 h (i.e., short-term stability) was designed to confirm that PaA in urine was stable even though it was collected at a room temperature of 37 °C. Testing the stability at 4 °C for 7 days (i.e., middle-term stability) was designed to confirm that PaA in urine was stable even though it was left in an auto-sampler. The stability at –20 °C for 30 days (i.e., long-term stability) was determined to confirm that PaA was stable even if the HPLC system stopped functioning and the analysis could not be continued for a long period of time. The freeze–thaw stability was investigated in order to confirm that PaA would not decompose during sequential analyses.

The stability of PaA over the short-term, middle-term, long-term, and the freeze–thaw cycles was found to be –4, 0, +2 and –4% change, respectively, compared to the value for fresh urine which was taken as 100%. Under all conditions, PaA in urine was stable.

3.4. Comparison of the PaA content in urine determined using the present HPLC assay and the microbioassay method

To demonstrate that the present HPLC assay could substitute for the microbioassay, we compared urinary excretion of PaA by the two methods.

The values obtained by HPLC were similar to those obtained with the microbioassay (Fig. 4). The linearity of the calibration curve was determined by plotting the values obtained by the HPLC assay (y) against those obtained by the microbioassay (x). The curve can be shown by $y = 1.349 + 0.741x$ ($r = 0.905$). The p value was <0.0001 . This result suggested that the HPLC assay is comparable to the microbioassay.

4. Conclusion

An assay was developed to determine the urinary excretion of PaA by isocratic reversed-phase HPLC and an ion-pair reagent. Using an ion-pair reagent and an isocratic-flow system produced a simple, rapid, sensitive, accurate and precise assay. The urinary excretion of PaA analyzed in our assay correlated well with microbioassay, which is currently the “gold standard”.

Acknowledgements

This report is part of project: Japanese Dietary Reference Intakes: elucidation of balance of micronutrient and macronutrient intakes (Principal investigator, Katsumi Shibata). The investigation was supported by a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare.

References

- [1] S.A. Bingham, *J. Nutr.* 133 (2003) 921S.
- [2] N. Tasevska, S.A. Runswick, A. Mctaggart, S.A. Bingham, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005) 1287.
- [3] N. Tasevska, S.A. Runswick, S.A. Bingham, *J. Nutr.* 136 (2006) 1334.
- [4] T. Fukuwatari, K. Shibata, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 54 (2008) 223.
- [5] L.D. Wright, H.R. Skeggs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 56 (1944) 95.
- [6] J.H. Walsh, B.W. Wyse, R.G. Hansen, *J. Food Biochem.* 3 (1979) 175.
- [7] J.H. Walsh, B.W. Wyse, R.G. Hansen, *J. Am. Diet. Assoc.* 78 (1981) 140.
- [8] H.C. Morris, P.M. Finglas, R.M. Faulks, M.R.A. Morgan, *J. Micronutr. Anal.* 4 (1988) 33.
- [9] P.M. Finglas, R.M. Faulks, H.C. Morris, K.J. Scott, M.R.A. Morgan, *J. Micronutr. Anal.* 4 (1988) 47.
- [10] A. Gonthier, P. Boullanger, V. Fayol, D.J. Hartmann, *J. Immunoassay* 19 (1998) 167.
- [11] K. Banno, M. Matsuoka, S. Horimoto, J. Kato, *J. Chromatogr.* 525 (1990) 255.
- [12] S.A. Haughey, A.A. O’Kane, G.A. Baxter, A. Kalman, M.-J. Trisconi, H.E. Indyk, G.A. Watene, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 1008.
- [13] R. Mittermayr, A. Kalman, M.-J. Trisconi, O. Heudi, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 1.
- [14] O. Heudi, P. Fontannaz, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 669.
- [15] M. Rychlik, *Analyst* 128 (2003) 832.
- [16] M. Endo, B. Yao, M. Saotome, T. Kamei, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38 (1991) 275.
- [17] T.-M. Wang, Y.-M. Chiu, L.-C. Lin, M.-C. Hsu, *J. Food Drug Anal.* 12 (2004) 1.
- [18] J.M. Romera, M. Ramirez, A. Gil, *J. Dairy Sci.* 79 (1996) 523.
- [19] D.C. Woollard, H.E. Indyk, S.K. Christiansen, *Food Chem.* 69 (2000) 201.
- [20] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspocho, J. Pagès, *Anal. Lett.* 28 (1995) 821.
- [21] C. Pakin, M. Bergaentzle, V. Hubscher, D. Aoudé-Werner, C. Hasselmann, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 87.

水溶性ビタミン

水溶性ビタミン, B群ビタミン, ビタミンC,
食事摂取基準, 策定基準

る。ただし、新たに母乳中の含量が報告された水溶性ビタミンはその点を考慮して、採用量を変更した。2005年版と2010年版の比較を表2にまとめた。とくに異なったものはビタミンB₁₂で、2005年以降に報告されている日本人の母乳中の含量に関する3論文¹⁻³⁾の数値の平均値0.45 μg/lを採用した。

乳児(0~5か月)は、母乳を適量摂取しているかぎり健常に発育する。したがって、目安量を設定した。目安量は母乳中のビタミン含量と哺乳量から策定した。男女で哺乳量に差異があるというデータは見当たらないので、男女差は考慮しなかった。なお、哺乳量は2005年以降1論文⁴⁾あったが、2005年版と同じく0.78 lであったので、2010年版でもこの値を採用した。

■乳児(6~11か月)

基本的な策定理論は2005年版と同じである。目安量を設定した。

①ビタミンB₁, ビタミンB₂, ビタミンB₆, ビタミンB₁₂, ナイアシン, 葉酸, ビオチン, ビタミンCの数値は、男女ごとに、乳児(0~5か月)の目安量に体表面積比、(6~11か月の基準体重/0~5か月の基準体重)^{0.75}をかけた数値(0~5か月の値から外挿した値という)と、18~29歳の推奨量(ビタミンB₁, ビタミンB₂, ナイアシンは身体活動レベルIIの推奨量を採用)あるいは目安量(ビオチン)に{(6~11か月の基準体重/18~29歳

滋賀県立大学 人間文化学部 生活栄養学科
柴田克己 *Shibata, Kazumi*
福渡 努 *Fukudate, Tsunomu*

■策定の基本方針

■化学名相当量を示し食事性ビタミン量として算定

2005年版と同じく、ビタミンの食事摂取基準の数値は、すべて食事性ビタミンの量として策定した。また、同一の生理作用を有するビタミンでも、食品中では補酵素型などとして複数の化学式を持つが、それらの量はそれぞれの表1に示した化学名相当量として示した。

■乳児(0~5か月)

基本的な策定理論は2005年版と同じであ

表1 水溶性ビタミンの数値の策定に用いた化合物の構造式と組成式

水溶性ビタミン名	化学名	構造式	組成式(分子量)
ビタミンB ₁	チアミン塩酸塩		C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS-HCl(337.3)
ビタミンB ₂	リボフラビン		C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆ (376.4)
ナイアシン	ニコチンアミド		C ₆ H ₆ N ₂ O ₂ (122.13)
ビタミンB ₆	ピリドキシン		C ₈ H ₁₁ N O ₃ (169.2)
ビタミンB ₁₂	シアノコバラミン		C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P (1355.37)
葉酸	プテロイルモノグルタミン酸		C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ (441.40)
パントテン酸	パントテン酸		C ₉ H ₁₇ NO ₅ (219.24)
ビオチン	D(+)-ビオチン		C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S (244.3)
ビタミンC	L-アスコルビン酸		C ₆ H ₈ O ₆ (176.12)

表2 2010年版と2005年版で採用された母乳中の水溶性ビタミン含量

水溶性ビタミン名	2010年版(mg/l)	2005年版(mg/l)
B ₁	0.13	0.15
B ₂	0.40	0.40
ナイアシン	2.0	2.0
B ₆	0.25	0.25
B ₁₂	0.00045	0.0002
葉酸	0.054	0.054
パントテン酸	5.0	5.0
ビオチン	0.005	0.0052
C	50	50

の基準体重)^{0.75}×(1+成長因子)} をかけた数値 (成人の推奨量から外挿した値という) の2つの値の平均値をまず計算した。つぎに、男女ごとに得られた数値の平均値を計算し、平滑化したものを乳児 (6~11 か月) の目安量とした。

②パントテン酸の数値は、乳児 (0~5 か月) の目安量に体表面積比、{6~11 か月の男女の基準体重の平均値/0~5 か月の男女の基準体重の平均値}^{0.75} をかけた数値から計算

した。

推定平均必要量設定のビタミン

基本的な策定理論は2005年版と同じである。

①生体情報を利用した水溶性ビタミンの推定
水溶性ビタミンの推定平均必要量の策定には2つの方法を採用した。ひとつは尿を用いる方法 (表3)、他のひとつは血液を用いる方法である (表3)。

尿中の値から推定平均必要量を策定したビタミンに B₁, B₂, ナイアシンがある。これら3つのビタミンはエネルギー代謝に不可欠であるので、エネルギー消費量当たりで策定した。ビタミン B₁ の推定平均必要量は 0.45 mg/1,000 kcal, ビタミン B₂ の推定平均必要量は 0.50 mg/1,000 kcal, ナイアシンの推定平均必要量は 4.8 mgNE/1,000 kcal である。NE というのは Niacin Equivalent (ナイア

表3 策定方法と算定された数値の比較

	方法	2010	2005
B ₁	尿中に排泄が認められる値から	RDA : 0.54mg/1,000kcal	RDA : 0.54mg/1,000kcal
B ₂	尿中に排泄が認められる値から	RDA : 0.60mg/1,000kcal	RDA : 0.60mg/1,000kcal
B ₆	血漿中の PLP 濃度 (30 nmol/l) を維持できる値から	RDA : 0.023 mg/g たんぱく質	RDA : 0.023 mg/g たんぱく質
B ₁₂	悪性貧血患者を正常に保つ値から	RDA : 2.4 μg/日	RDA : 2.4 μg/日
ナイアシン	尿中の MNA 量が 1 mg/日に維持される値から	RDA : 5.8 mg NE/1,000 kcal	RDA : 5.8 mg NE/1,000 kcal
パントテン酸	国民健康・栄養調査の平均値	AI : 6 mg/日	AI : 6 mg/日
葉酸	赤血球中葉酸濃度 (300 nmol/l 以上) と血漿総ホモシステイン濃度 (14 μmol/l 未満) に維持できる値から	RDA : 240 μg/日	RDA : 240 μg/日
ビオチン	食事調査の値から	AI : 50 μg/d	AI : 45 μg/d
C	血漿 C 濃度 (50 μmol/l) を維持できる量から	RDA : 100 mg/d	RDA : 100 mg/d

シン当量)の略語である。

血液中の値から推定平均必要量を策定したビタミンにB₆, B₁₂, 葉酸, Cがある。ビタミンB₆がかかわる主要な代謝はアミノ酸の異化代謝であるので、推定平均必要量はたんぱく質消費量当たりで策定した。その推定平均必要量は0.019 mg/gたんぱく質である。

ヒトではビタミンB₁₂を必要とする酵素は2つだけである。そのひとつはメチオニンシンターゼである。この酵素は循環器系疾患発症のリスクファクターのひとつであるホモシステインという非常に酸化力の強いアミノ酸の消去にかかわっている。葉酸は、このメチオニンシンターゼの補酵素である。この反応(ホモシステイン→メチオニン)の律速因子は葉酸であるので、葉酸の栄養状態が良好でないと、血液中にホモシステインが蓄積する。大赤血球性貧血という疾病は、葉酸あるいはビタミンB₁₂が欠乏しても発症するが、これもこのメチオニンシンターゼがかかわっている。ビタミンB₁₂の成人の推定平均必要量は2 μg/日、葉酸の成人推定平均必要量は200 μg/日である。

ビタミンCの必要量は壊血病を予防できる量ではなく、心臓疾患系の疾病の予防効果ならびに有効な抗酸化作用を発揮できる血漿ビタミンC濃度を指標として策定した。Cの成人の推定平均必要量は85 mg/日である。

推奨量は推定平均必要量×1.2とした(表2)。

②外挿方法

ビタミンB₁, ビタミンB₂, ナイアシンは推定エネルギー必要量の比較から数値を策定した。ビタミンB₆は、たんぱく質の推奨量との比較から策定した。

ビタミンB₁₂, 葉酸, ビタミンCは、体表面積値の比較を示す式, {(対象年齢区分の基準体重/18~29歳の基準体重)^{0.75}×(1+成長因子)}から策定した。これら3つのビタミンの必要量に男女差があるというデータは見当たらないので、男女差はつけず、男女ごとに計算した値の平均値を計算し、平滑化した。成長因子には、6か月~2歳=0.30, 3~14歳=0.15, 15~17歳の男子=0.15, 15~17歳の女子=0.00, とした。

目安量設定のビタミン

基本的な策定理論は2005年版と同じである。パントテン酸とビオチンについては、「1歳以上」も目安量を設定した。「1歳以上」の推定平均必要量を設定できるに足る十分なデータがまだ得られないためである。通常の食生活をしている人では、欠乏症は認められていない。

パントテン酸の値は食事調査結果をもとにして策定した。

ビオチンは報告のない年齢区分があるので、体表面積値の比較を示す式, {(対象年齢区分の基準体重/18~29歳の基準体重)^{0.75}×(1+成長因子)}から策定した。ビオチンの必要量に男女差があるというデータは見当たらないので、男女差はつけず、男女ごとに計算した値の平均値を計算し、平滑化した。

相対生体利用率

2010年版で新たに採用された概念である。表4に相対生体利用率の数値をまとめた。9種類の水溶性ビタミンのなかでビタミンCを除く8種類のB群ビタミンは、食品中ではほとんどが結合型ビタミン、すなわち、主としてたんぱく質と結合した状態で存在してい

表4 相対生体利用率

水溶性ビタミン名	相対生体利用率(%)
B ₁	60
B ₂	60
ナイアシン	60
B ₆	73
B ₁₂	50*
葉酸	50
パントテン酸	70
ビオチン	80
C	100

*相対生体利用率を求めることができないので、吸収率を示した。

る。また、植物性食品では、糖質などと結合した状態でも存在する。したがって、食品中のB群ビタミンは吸収される前に遊離型の状態にまで消化されるという過程が必要である。したがって、遊離型のビタミン（サプリメントもしくはビタミン剤）を摂取したときと結合型のビタミンがほとんどである食事由来のときと相対生体利用率が異なる。

推定平均必要量を設定するための実験は、遊離型のB群ビタミンを負荷して求めたものと食事由来のビタミンだけから求めた実験が混在している。遊離型のビタミンを投与して求めた推定平均必要量には、この点を考慮して通常の食事をとっているときの推定平均必要量に換算する設定が必要である。

■妊産婦

基本的な策定理論は2005年版と同じである。妊婦の付加量は、各ビタミンの代謝特性を考慮して策定した。ただし、トリプトファン-ナイアシン転換率が非妊娠時に比べて増大する⁵⁾ ことにより、付加量をまかなっている。したがって、ナイアシンの付加量は不要とした。

表5 水溶性ビタミンの耐容上限量の比較(男子18~29歳)

ビタミン名	2010年度版	2005年度版
ビタミンB ₁	—	—
ビタミンB ₂	—	—
ナイアシン	—	—
ニコチン酸	1.25mg/kg体重	100mg/日
ニコチンアミド	5mg/kg体重	300mg/日
ビタミンB ₆	0.86mg/kg体重	60mg/日
ビタミンB ₁₂	—	—
葉酸	27μg/kg体重	1,000μg/日
パントテン酸	—	—
ビオチン	—	—
ビタミンC	—	—

■授乳婦

基本的な策定理論は2005年版と同じである。授乳婦の付加量は、基本的に母乳中のビタミン含量と1日当たりの泌乳量（哺乳量と同値とみなした）から計算した。ただし、パントテン酸に関しては、この考え方を採用しなかった。その理由は、パントテン酸は目安量で設定されているため、すでに必要量以上の数値が示されている。そこで、非授乳婦と授乳婦のパントテン酸摂取量の比較から授乳婦の付加量を1mg/日とした。

■耐容上限量

耐容上限量は、ビタミン強化食品あるいはサプリメントとして摂取するときのみ適用される値である。耐容上限量までは、健康障害を引き起こす危険性は低いという数値で、健康の維持・増進に効果があるという意味の数値ではない。2005年版では1日当たりの量として算定したが、2010年版では体重1kg当たりの値を算定し、この値に基準体重をかけて算定した（表5）。

最後に2010年版の水溶性ビタミンの食事

表6 水溶性ビタミンの1日当たりの推奨量と目安量(目安量の数値には下線を引いた)

性別	女性										男性									
	B ₁ * mg	B ₂ * mg	ナイアシン [†] mgNE	B ₆ mg	B ₁₂ μg	葉酸 μg	パント酸 mg	ビオチン μg	C mg	B ₁ * mg	B ₂ * mg	ナイアシン [†] mgNE	B ₆ mg	B ₁₂ μg	葉酸 μg	パント酸 mg	ビオチン μg	C mg		
年齢区分																				
0～(月)	0.1	0.3	2	0.2	0.4	40	4	4	40	0.1	0.3	2	0.2	0.4	40	4	4	40		
6～(月)	0.3	0.4	3	0.3	0.6	65	5	10	40	0.3	0.4	3	0.3	0.6	60	5	10	40		
1～2(歳)	0.5	0.5	5	0.5	0.9	100	3	20	40	0.5	0.6	6	0.5	0.9	90	3	20	40		
3～5(歳)	0.7	0.8	7	0.6	1.1	110	4	25	45	0.7	0.8	7	0.6	1.1	110	4	25	45		
6～7(歳)	0.8	0.9	8	0.7	1.4	140	5	30	60	0.8	0.9	9	0.8	1.4	140	5	30	60		
8～9(歳)	1.0	1.0	10	0.9	1.6	160	5	35	70	1.0	1.1	10	0.9	1.6	160	5	35	70		
10～11(歳)	1.2	1.2	12	1.0	1.9	190	6	40	80	1.2	1.4	13	1.0	1.9	200	7	40	80		
12～14(歳)	1.2	1.4	13	1.3	2.4	240	6	50	100	1.4	1.5	14	1.3	2.4	240	7	50	100		
15～17(歳)	1.2	1.4	13	1.3	2.4	240	5	50	100	1.5	1.7	16	1.4	2.4	240	7	50	100		
18～29(歳)	1.1	1.2	11	1.1	2.4	240	5	50	100	1.4	1.6	15	1.4	2.4	240	5	50	100		
30～49(歳)	1.1	1.2	12	1.1	2.4	240	5	50	100	1.4	1.6	15	1.4	2.4	240	5	50	100		
50～69(歳)	1.0	1.2	11	1.1	2.4	240	5	50	100	1.3	1.5	14	1.4	2.4	240	5	50	100		
70以上(歳)	0.8	1.0	10	1.1	2.4	240	5	50	100	1.2	1.3	13	1.4	2.4	240	5	50	100		
妊婦(付加量)																				
初期	+0.0	+0.0	+0	+0.8	+0.4	+240	+1	+2	+10											
中期	+0.1	+0.2	+0	+0.8	+0.4	+240	+1	+2	+10											
末期	+0.2	+0.3	+0	+0.8	+0.4	+240	+1	+2	+10											
授乳婦(付加量)	+0.2	+0.4	+3	+0.3	+0.8	+100	+1	+5	+40											

*身体活動レベル(II)の推定エネルギー必要量を用いて算出した。

1. 0～と6～の数値は、すべての水溶性ビタミンで「目安量」である。

2. 1歳以上において、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、ナイアシン、葉酸、ビタミンCの数値は、「推奨摂取量」である。

3. パント酸とビオチンは、1歳以上の数値においても、「目安量」である。

4. ビタミンB₉の数値は、チアミン塩酸塩としての数値である。

摂取基準の表を、表6にまとめた。

文献

1) Sakurai T, Furukawa M, Asoh M, et al. Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women. J Nutr Sci Vitaminol 2005; 51(4): 239-47.

2) 渡邊敏明, 谷口歩美, 庄子佳文子, ほか. 日本人の母乳中の水溶性ビタミン含量についての検討. ビタミン 2005; 79(12): 573-81.
 3) 柴田克己, 遠藤美佳, 山内麻衣子, ほか. 日本人の母乳中(月齢1~5)の水溶性ビタミン含量(資料). 日本栄養・食糧学会誌, 2009; 62(4): 185-90.
 4) 廣瀬潤子, 遠藤美佳, 柴田克己, ほか. 日本人母乳栄養児(0~5カ月)の哺乳量. 日本哺乳学会誌 2008; 2: 23-8.

What's NEW!
(保育園用)
Kids'カロリ~
 新機能を追加して
 リニューアル
 しました!

多彩なソフトでニーズに応じた栄養管理のお手伝い。

カロリ・シリーズ

"おかげさまで" 信頼と実績の **(全国4200ユーザー)** 安心の保守契約制度で万全です。



Kids'カロリ (保育園用)

園児の献立管理からアレルギーなどの禁食情報管理、身長、体重の記録や成長曲線の印刷ができます。

Charry Health (保健指導・栄養指導ソフト)

食事調査と運動調査から、行動目標をたてて栄養指導。保健指導ではXML出力機能も装備。

Carerise (栄養ケア・マネジメント)

2008年厚労省通知の新事務処理手順対応。施設および病院、両方の栄養ケアに対応できます。

プロカロリ (施設用)

個別献立・禁食・喫食率まで管理できる施設向け総合栄養管理システムです。

メディカロリ (病院・老健施設用)

個別献立への対応、禁食や喫食率などきめ細かくかつ幅広い運用ができる総合栄養管理システム。

Myカロリ

栄養価計算の決定版! 料理サンプルを利用してすぐに運用開始!

直接お問い合わせ ホームページ 文庫・資料の送付先へ

<http://www.tsc-inc.co.jp>

(東北・北海道)	秋田営業所 ☎018-898-7015	大宮市 (特)エスケープシステム ☎072-895-2727	福岡支店 ☎092-431-0020
秋田市	☎019-71-1111	(中国・四国)	岡山支店 ☎092-919-7372
盛岡市 (特)システムベース	☎022-782-8918	鳥取支店 ☎086-456-4987	広島支店 ☎082-655-5372
仙台市 (特)メイトアップ	☎022-263-4511	奈良支店 ☎0946-22-2558	京都支店 ☎090-993-6210
仙台市 (特)富士エビシステム	☎0243-22-7076	山口支店 (特)西日本朝市システム	西宮支店 ☎093-959-0240
二本松市 (特)エイブル		高松支店	☎087-812-6611
(関東・中部)	関東営業所 ☎03-5363-7361	高松市 都島電業(株)	高松支店 ☎086-385-5900
東京都 (特)アビ・グローバル		徳島市 都島電業(株)	徳島支店 ☎087-229-7661
相模原市 (特)中野システムサポート	☎042-785-4882	松山市 (特)アビ・グローバル	松山支店 ☎089-943-3725
金沢市 (特)西日本朝市システム	☎076-291-8350	高知市 都島電業(株)	高知支店 ☎098-882-1216
名古屋市 パウチンビジネス(株)	本社 ☎052-593-8205	高知市 (特)西日本朝市システム	高知支店 ☎098-803-5205
長野市 (特)いとう	☎026-221-6544	(九州・沖縄)	九州営業所 ☎092-432-8877
(関西)	大阪支店 ☎06-6442-8840	福岡支店	☎06-6772-8751
大阪市 (特)アビ・グローバル		福岡市 (特)アビ・グローバル	
大阪市 (特)アルファシステム			

福岡支店	福岡支店 ☎092-431-0020	福岡支店	福岡支店 ☎092-919-7372
福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775	福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775
福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775	福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775
福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775	福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775
福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775	福岡支店	福岡支店 ☎092-918-4775

ホームページで詳細のダウンロード情報を見る 直接お問い合わせ

ホームページの最新情報を見る 直接お問い合わせ

電子カルテ・オータリング連携

各メーカーと連携実績があります。

共有設定ソフト

複数のPCから同時入力可能です。

リンク設定ソフト

複数施設を1カ所から管理可能です。

学校教育用

①授業用
②先生用 ③学生用

①②③どのソフトも格安にてライセンス販売可能です。詳細はお問い合わせください。

ダウンロード対応

さし絵や料理データをダウンロードして追加できる特典もあります。

開発元

トータルソフトウェア株式会社

〒890-0082 鹿児島市紫原3丁目21-7
 Tel.099-253-6041 Fax.099-253-6079

BSI

ISO27001 (ISMS) 認証取得

IS 530476 / ISO (JIS Q) 27001

個人情報保護に関する基本方針

当社は、「個人情報」の重要さを深く認識し、弊社スタッフが個人情報を扱う際の権限を十分に把握し厳格に努めるとともに、プライバシーポリシーを定め、これを業として個人情報保護に全力で取り組みます。(弊社ホームページをご覧ください)

※Windows 98, NT, 2000, Me, XP, Vista対応
 ※Windows 98, NT, 2000, Me, XP, Vistaは米国Microsoft社の登録商標です。

534 臨床栄養 Vol. 115 No. 5 2009. 10

— 276 —

トピックス

高齢者のビタミンサプリメント摂取－健康維持に良いことと悪いこと－*

Vitamin supplement intake in elderly peoples
- Good for the health maintenance and bad -

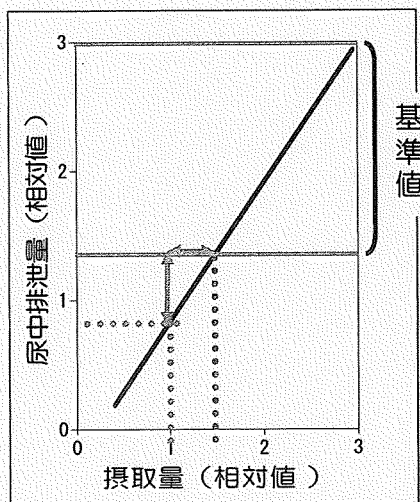
高齢期になると、若年・壮年成人期と比較して、消化・吸収能力やそれに続く同化・異化代謝能力が低下してくる。つまり、高齢者の健康の維持には、生物材料から成る通常の食事形態中のB群ビタミンの生体利用率は低下している¹¹⁾²⁾、消化・吸収能力やそれに続く同化・異化代謝能力の影響を受けにくい栄養素のみから成るサプリメント型食事形態の利用を考えるなど、特別な配慮が必要である。ただし、サプリメント型利用の場合は、過剰摂取による健康障害発現³⁾⁹⁾(人では、①ニコチンアミドによる消化不良・ひどい下痢・便秘などの消化器障害や肝機能低下・劇症肝炎などの肝臓障害、②ピリドキシンによる感覚性ニューロパシー、③プテロイルモノグルタミン酸による葉酸代謝の拮抗作用、が知られている。)が危惧されるので、健康障害予知のために尿中に排泄されるB群ビタミン量をモニターする必要がある。

1. 高齢者の定義

日本では、国民の健康の維持・増進、過剰摂取による健康障害の予防を目的とし、エネルギーおよび各栄養素の摂取量の基準を示すものとして、食事摂取基準(2010年版)¹⁰⁾が策定されている。この食事摂取基準での高齢者は70歳以上とされているので、このシンポジウムでも70歳以上を高齢者とする。

2. 高齢者のB群ビタミン摂取量の現状

国民健康・栄養調査(平成18年国民健康・栄養調査報告)¹¹⁾によるB群ビタミンの摂取量をみると、平均値は必要量を超えているが、分布の幅が非常に大きいのが特徴である。これは、サプリメント型ビタミンを摂取しているためである。したがって、高齢者のB群ビタミンの栄養状態を評価するには、高齢者集団においては、平均値による評価は意



摂取量という食品側の情報のみでは、個人の真の必要量に対応する指導はできないし、労働・環境変化に応じて変動する必要量にも対応できない。

一方、尿中排泄量は、生体利用率を加味した個人の真の必要量を示す生体側の情報として利用可能。

例えば・・・

尿中排泄量が基準値に達していなければ

基準値に達するために必要な摂取量を算出し、生体利用率を加味した補足すべき量を提言するという栄養指導が可能

図1. 不足状態の人に対するB群ビタミンサプリメント付加量算出の試みの概念図

*このトピックスは、平成20年ビタミンB研究委員会シンポジウム(平成21年2月13日)「B群ビタミン研究の最前線－生理作用から薬理作用まで－」での講演をまとめたものである。

味をなさず、個々人の評価が特に必要となる。また、上記のように、高齢期においては、若年・壮年成人期と比較して、消化・吸収能力の低下が起因となり、B群ビタミンが補酵素化される同化反応に必要な閾値に達しにくくなり、連動して異化代謝経路も低下してくると考えられるので、B群ビタミンの栄養状態の評価には食事摂取量から計算したB群ビタミン摂取量のみで評価するのは危険であり、尿や血液などの生体指標を用いる評価方法も必要となる。

3. B群ビタミン摂取量によるB群ビタミン栄養状態評価方法を補完するB群ビタミン尿中排泄量

我々は、B群ビタミンの栄養状態の評価にはB群ビタミン尿中排泄量が活用できることを明らかにしたので¹²⁾¹³⁾、高齢者の尿中へのB群ビタミン排泄量に基づく、B群ビタミンサプリメントの好ましい摂取方法を紹介する。

4. 高齢者のB群ビタミン尿中排泄量

どのB群ビタミンも、排泄量の分布の幅が広く、最小と最大の値が10～100倍も異なっているのが特徴であった。つまり、不足状態の人も過剰摂取による健康障害の発現が危惧される可能性の人もいた(未発表)。

そこで、高齢者に対して、B群ビタミンの個人に合った適量を摂取することを指導するための活動をしている。

具体的には、不足状態の人には尿中に排泄される量を基準値の下限に達するためには、習慣的な食事に加えて、どの程度の量のビタミンサプリメントを摂取したらよいかを示し、自分に合ったビタミンサプリメント剤を作成する試みを(図1)。一方、基準値(暫定)¹⁴⁾の上限を超える人には、基準値(暫定)の上限を超える量を摂取しても健康の維持・増進には全く寄与しないという知識を与えることで、過剰摂取による健康障害を未然に防ぐ栄養教育を行っている(図2)。

Key Words : elderly people, urine, vitamin, supplement

¹Department of Food Science and Nutrition, School of Human Cultures, The University of Shiga Prefecture, Shiga, Japan

²Department of Health and Nutrition, School of Health and Human Life, Nagoya Bunri University, Aichi, Japan

Katsumi Shibata¹, Tomiko Tsuji^{1,2}, Tsutomu Fukuwatari¹

¹滋賀県立大学 人間文化学部 生活栄養学科

²名古屋文理大学 健康生活学部 健康栄養学科

柴田 克己¹, 辻 とみ子^{1,2}, 福渡 努¹

1日尿中の水溶性ビタミン排泄量

ID	
氏名	

測定ビタミン (単位)	測定結果	基準値	コメント
ビタミンB ₁ (nmol/日)	5789	300~1200	サプリメントなどからビタミンB ₁ を摂取している可能性があります。用量に気をつけてビタミンB ₁ を摂取してください。
ビタミンB ₂ (nmol/日)	2345	200~900	サプリメントなどからビタミンB ₂ を摂取している可能性があります。用量に気をつけてビタミンB ₂ を摂取してください。
ビタミンB ₆ (μmol/日)	9.2	3.0~8.0	基準値以上の値ですが、ビタミンB ₆ の摂取には問題ありません。
ナイアシン (μmol/日)	87	50~150	ナイアシンの摂取に問題はありません
パントテン酸 (μmol/日)	21	10~30	パントテン酸の摂取に問題はありません
葉酸 (nmol/日)	37	15~40	葉酸の摂取に問題はありません
ビオチン (nmol/日)	92	50~150	ビオチンの摂取に問題はありません
ビタミンC (μmol/日)	78	150~1200	ビタミンCを十分に摂取できていない可能性があります。
判定	B	ビタミンの摂取に関して、問題はありません。ただし、サプリメントなどからビタミンを摂取している可能性があるため、用量に気をつけてください。	

図2. 尿中の水溶性ビタミン排泄量に基づく水溶性ビタミン栄養状態の評価例

文 献

- 1) 福渡努, 柴田克己 (2008) 遊離型ビタミンに対する食事中のB群ビタミンの相対利用率. 日本家政学雑誌 **59**, 403-410
- 2) 福渡努, 柴田克己 (2009) 1日食事に含まれるB群ビタミンの生体利用率に関する研究. II. パンを主食とした食事に含まれるB群ビタミンの遊離型ビタミンに対する相対利用率. 日本家政学雑誌 **60**, 57-63
- 3) Fukuwatari T, Wada H, Sasaki R, Shibata K (2004) Effects of excess nicotinamide administration on the urinary excretion of nicotinamide *N*-oxide and nicotinuric acid in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 44-50
- 4) Shibata K, Takahashi C, Fukuwatari T, Sasaki R (2005) Effects of excess pantothenic acid administration on the water-soluble vitamin metabolisms in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **51**, 385-391
- 5) Sawamura H, Fukuwatari T, Shibata K (2007) Effects of excess biotin administration on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in young rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2977-2984
- 6) 福渡努, 柴田克己 (2008) 葉酸の大量摂取が幼若ラットの成長と水溶性ビタミン排泄におよぼす影響. 日本食品衛生学会誌, **49**, 51-55
- 7) 福渡努, 葛谷真子, 佐藤志織, 柴田克己 (2009) ラットへのビタミンB₁あるいはビタミンB₂の過剰投与がB群ビタミンの尿中排泄量におよぼす影響. 日本食品衛生学会誌 **50**, 70-74
- 8) 福渡努, 伊藤景子, 柴田克己 (2009) ラットへのピリドキシンの過剰投与がB群ビタミンの尿中排泄量におよぼす影響. 日本食品衛生学会誌 **50**, 75-79
- 9) 福渡努, 倉田華織, 柴田克己 (2009) ラットへのニコチン酸の過剰投与がB群ビタミンとトリプトファン-ニコチンアミド代謝物の尿中排泄量におよぼす影響. 日本食品衛生学会誌 **50**, 80-84
- 10) 日本人の食事摂取基準 (2010年版), 「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書, 平成21年5月, 厚生労働省
- 11) 平成18年国民健康・栄養調査報告, 平成21年1月, 厚生労働省
- 12) Shibata K, Fukuwatari T, Ohta M, Okamoto H, Watanabe T, Fukui T, Nishimuta M, Totani M, Kimura M, Ohishi N, Nakashima M, Watanabe F, Miyamoto E, Shigeoka S, Takeda T, Murakami M, Ihara H, Hashizume N (2005) Values of water-soluble vitamins in blood and urine of Japanese young men and women consuming a semi-purified diet based on the Japanese Dietary Reference Intakes. *J Nutr Sci Vitaminol* **51**, 319-328
- 13) Fukuwatari T, Shibata K (2008) Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* **54**, 223-229
- 14) 柴田克己, 岡野登志夫, 吉田宗弘, 佐々木敏, 由田克士 (2008) 日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究-微量栄養素と多量栄養素摂取量とのバランスの解明-. pp.362-366. 平成19年度厚生労働科学研究 循環器疾患等生活習慣病対策総合研究・糖尿病戦略等研究 研究成果発表会(研究者向け)報告書, 厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業, 財団法人循環器病研究振興財団

乳児における市販離乳食からの微量ミネラルの摂取

吉田 宗 弘, 乾 由衣子, 福 永 健 治
(関西大学化学生命工学部食品工学研究室*)

Intake of Trace Minerals from Commercial Baby Foods in Japanese Infants

Munehiro YOSHIDA, Yuiko INUI and Kenji FUKUNAGA

Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Summary

To estimate trace mineral intake in Japanese infants dependent to commercial baby foods and human milk, 53 commercial baby food samples (24 samples were for 7 or more mo baby and 29 samples were for 9 or more mo baby) were collected and their iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), selenium (Se) and molybdenum (Mo) concentrations were determined by atomic absorption spectrometry (Fe, Zn, Cu and Mn) or inductively coupled plasma mass spectrometry (Se and Mo). Trace mineral concentrations in baby foods for 7 or more mo baby and 9 or more baby were as follows, respectively (mean \pm SD): Fe (mg/kcal), 2.36 ± 0.98 and 3.48 ± 3.21 ; Zn (mg/kcal), 2.00 ± 0.93 and 2.37 ± 1.12 ; Cu (mg/kcal), 0.44 ± 0.13 and 0.54 ± 0.31 ; Mn (mg/kcal), 1.03 ± 0.51 and 1.16 ± 0.49 ; Se (μ g/kcal), 22.9 ± 21.4 and 15.8 ± 9.1 ; Mo (μ g/kcal), 36.6 ± 29.4 and 36.0 ± 30.1 . Trace mineral intakes in 6 to 8 mo infants and 9 to 11 mo infants dependent to human milk and commercial baby foods were estimated to be as follows, respectively: Fe (mg/d) 0.66 and 1.76; Zn (mg/d), 1.44 and 1.89; Cu (mg/d), 0.29 and 0.41; Mn (mg/d), 0.17 and 0.64; Se (μ g/d), 14.1 and 14.9; Mo (μ g/d), 8.1 and 17.7.

わが国では、国民の健康の維持・増進、エネルギー・栄養素欠乏の予防などを目的として、エネルギーおよび各栄養素の摂取量の基準を示すために、食事摂取基準 (dietary reference intakes: DRIs) を策定している。この中で、乳児に対しては、一部を除いて、各栄養素の母乳中濃度をもとに摂取の目安量 (adequate intake: AI) を設定している¹⁾。これは、現在の日本の乳児において、栄養素摂取の不足・過剰に起因する顕著な健康障害が認められないという事実をふまえたものである。

生後5か月を経過すると、多くの乳児は母乳とともに離乳食を摂取し始める。したがって、生後6か月以降に関しては、母乳と離乳食からの栄養素摂取量にもとづいたAIの策定、もしくは1歳以降と同様に、推定平均必要量 (estimated average requirement: EAR) にもとづいて摂取の推奨量 (recommended dietary allowance: RDA) を設定するのが妥当である。しかし、微量ミネラルの場合、2010年版DRIsにおいても、6か月以降乳児に対しては、鉄がRDA、銅とマンガンが離乳食摂取を考慮したAIが設定され、その他に関しては依然として母乳中濃度のみにもとづいたAIが設定されている。これは、6か月以降乳児を対象とした、栄養素必要量に関する研究や栄養素摂取量調査が不十分で

あることに起因している。

ところで育児書においては、離乳食を生後5か月頃から開始し、生後6か月以降は1日5食と考え、6~8か月では5食中2食、9~11か月では5食中3食を離乳食として、12か月に離乳を完了することを基本としている。中絶らは、全国の乳児を対象に実施した調査において、7か月児と10か月児の離乳食からの平均エネルギー摂取量がそれぞれ173、および456 kcal/d、人工乳からの平均エネルギー摂取量がそれぞれ468、および313 kcal/dであることを示している²⁾。一方、平成17年度に厚生労働省が実施した乳幼児栄養実態調査においては、離乳食開始、および完了時期としてもっとも多かったのは、それぞれ生後5か月(47.5%)と生後12か月(47.9%)である³⁾。これらのことは、現実の乳児においてほぼ基本どおりに離乳が進行していることを示している。

最初にも述べたように、本格的に離乳食を開始した6か月以降乳児の食事摂取基準を策定するには、離乳食からの栄養素摂取量を明らかにすることが必要である。離乳食には、母親の手作りのものと、市販のものがある。平成17年度乳幼児栄養実態調査においては、市販の離乳食をよく使うという回答は28.0%、時々使うという回答は47.8%

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)