

・乳酸菌保存用培地（1L 中，pH6.8±0.1）

酵母エキス 5.5g
ペプトン 12.5g
ブドウ糖 11.0g
リン酸水素二カリウム 0.25g
硫酸第一鉄 5.0mg
リン酸二水素カリウム 0.25g
酢酸ナトリウム（無水） 10.0g
硫酸マグネシウム 0.1g
硫酸マンガン 5.0mg
粉末寒天 20.0g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている^{注1)}

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

② 接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し，35℃で20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し，600nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し，接種菌液とする。

③ 試験溶液の調製

試料2g^{注2)}を精密に量り，0.5mol/L硫酸100mlを加え，121℃で30分間オートクレーブ処理を行う。冷却後，5mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6.8に調整後，水で200mlに定容し，ろ過する。更に，最終溶液中のナイアシンの濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈し，試験溶液とする。

④ 測定

試験管2本ずつに試料溶液0.5，1及び2mlを正確に加え，次に各試験管に測定用培地2.5ml及び水を加えて全量を5mlとする。別に検量線作成のため，ニコチン酸標準溶液（0～0.75ng相当量^{注3)}）を試験管2本ずつにとり，それぞれに測定用培地2.5ml及び水を加えて全量を5mlとする。121℃で45分間オートクレーブ処理を行い，冷却後，各試験管に接種菌溶液1滴（約30μl）ずつを無菌的に接種し，37℃で18時間程度ふ卵器に入れて培養する。

培養後，増殖度を600nmの濁度を用いて測定する^{注4)}。標準溶液の濁度より検量線を作成し，これに試験溶液より得られた濁度を照合して，試験溶液中のナイアシン量を求め，試料中のナイアシン含量を算出する。

計算式

試料中のナイアシン含有量(mg/100g) = $A \times N \times V \times 100 / (W \times 1000 \times 1000)$

A：検量線より算出した試験溶液中のナイアシン含量(ng)

V：定容量 N：希釈値 W：秤取量(g)

[注]

- 1) ニコチン酸定量用基礎培地「ニッスイ」：日水製薬
 一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」：日水製薬
 一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」：日水製薬（前培養培地に同じ）
- 2) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。
- 3) 予め標準溶液濃度と生育の相関範囲を確認しておく。必要であればデータを確認した上で、適宜標準溶液濃度を変更することができる。
- ~~4) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダーで濁度を測定することもできる。マイクロプレートを使用する場合は試験菌の調製や、標準溶液および試験溶液の濃度を調整し、培養は嫌気条件下で行う必要がある。~~

<トリプトファンの定量>

(1) 高速液体クロマトグラフ法^{注1)}

① 試薬

- ・標準溶液：トリプトファン 50mg を精秤する。0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液に溶解後、100ml に定容し、水で 50 倍希釈する。(10 μg/ml)
- ・水酸化バリウム（特級）

② 試験溶液の調製

試料 0.1~1 g^{注2)} 及び水酸化バリウム 7.8 g を封管用試験管に精秤し、水 4.5 ml 及び 60% (V/V) チオジエチレングリコール 0.5 ml を加え、沸騰水浴中で水酸化バリウムを加熱溶解する^{注3)}。溶解後、減圧下で脱気し、封管後、110℃（恒温乾燥機）で 12 時間加水分解する。冷却後、開管し、加水分解液を 50 ml または 100 ml 容メスフラスコ（1W/V% フェノールフタレイン溶液を数滴加えておく）に移した後、微アルカリに調整後、定容し適宜水で希釈する。 0.45 μm のフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

③ 測定

試験溶液一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、トリプトファンのピーク面積または高さを測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られたピーク面積又は高さから、試料中のトリプトファン含量を求める。

<高速液体クロマトグラフ操作条件例>

- カラム：内径 4.6mm，長さ 250mm，ステンレス製^{注4)}
- 移動相：10mmol/L 過塩素酸－メタノール (92：8V/V)
- 検出器：蛍光分光光度計
- 測定波長：励起波長 285 nm，蛍光波長 348 nm
- 流量：1.0 ml/分
- 温度：50℃
- 注入量：20 μl

[注]

- 1) アミノ酸自動分析法でも測定できる。

- 2) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって試料量は適宜変更することが出来る。
- 3) トリプトファンは塩酸加水分解では破壊されるため、アルカリを用いた加水分解を行う。
- 4) Inertsil ODS-2 (ジーエルサイエンス製) 又は同等品を用いる。

<ナイアシン当量の算定>

ナイアシン当量は、次式によって算定する。

ナイアシン当量 (mg/100g) = ニコチン酸 (mg/100g) + ニコチン酸アミド (mg/100g) + 1/60 トリプトファン (mg/100g) = ナイアシン定量用基礎培地法によるナイアシン (mg/100g) + 1/60 トリプトファン (mg/100g)

22 パントテン酸

(1) 微生物定量法

① 試薬

・パントテン酸カルシウム標準溶液：D-パントテン酸カルシウム標準品^{注1)} 100mg を 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし、正確に 100ml とする。更に、水で希釈して 0.1 μg/ml となるようにする。

・ハト肝臓アミダーゼ溶液：ハト肝臓アセトンパウダー^{注2)} (Sigma L 8376 または同等品) 10g に、氷冷した 0.02 M 炭酸水素カリウム水溶液 50ml を加え、氷冷しながらすり鉢などでつぶして懸濁液とする。この懸濁液を氷冷した 0.02 M 炭酸水素カリウム水溶液 50ml で遠心管に移し、冷却しながら遠心分離 (3000 回転/分, 10 分間) する。上澄み液にイオン交換樹脂 (Dowex 1×8) 5g を加え、約 1 時間氷冷しながら攪拌する。冷却遠心分離、イオン交換樹脂の添加ならびに氷冷攪拌の操作を 3 回繰り返す。さらに冷却遠心分離 (3000 回転/分, 10 分間) を行って得られる上澄み液をハト肝臓アミダーゼ溶液とする。

・アルカリホスファターゼ溶液：アルカリホスファターゼ (Sigma P 7640, Type I-S または同等品) を水に溶かして 2% (W/V) とする。

・トリス塩酸緩衝液：2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1, 3-プロパンジオール 24.2g を水 200ml に溶かし、30% 塩酸溶液で pH8.3 に調整する。

・炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム 850mg を水に溶かして 100ml とする。

・使用菌株：Lactobacillus plantarum^{注3)} (ATCC 8014)

・パントテン酸測定用培地 (1L 中, pH6.8±0.1)

カザミノ酸	14g
L-シスチン	400mg
DL-トリプトファン	200mg
硫酸アデニン	20mg
塩酸グアニン	20mg
ウラシル	20mg
塩酸チアミン	200 μg
リボフラビン	400 μg

パラアミノ安息香酸 200 μ g
ビオチン 0.8 μ g
ニコチン酸 1mg
塩酸ピリドキシン 800 μ g
リン酸二水素カリウム 1g
リン酸一水素カリウム 1g
硫酸マグネシウム 400mg
硫酸第一鉄 20mg
硫酸マンガン 20mg
酢酸ナトリウム（無水） 20g
グルコース 40g

・乳酸菌保存用培地（1L 中，pH6.8 \pm 0.1）

酵母エキス 5.5g
ペプトン 12.5g
ブドウ糖 11.0g
リン酸一水素カリウム 0.25g
硫酸第一鉄 5.0mg
リン酸二水素カリウム 0.25g
酢酸ナトリウム（無水） 10g
硫酸マグネシウム 0.1g
硫酸マンガン 5.0mg
粉末寒天 20.0g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている^{注4)}。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

② 接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し，35℃で20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し，600nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し，接種菌液とする。

③ 試験溶液の調製

試料2g^{注5)}を精秤してトリス塩酸緩衝液10mlと水20mlを加え，121℃で15分間加圧抽出する。冷却後，水を加えて全量を50mlとし，その5mlを試験管に分取して炭酸水素ナトリウム溶液0.1ml，2%（W/V）アルカリホスファターゼ水溶液0.4ml，ハト肝臓アミダーゼ溶液0.2mlを加え，静かに混合する。トルエンを2～3滴加え，37℃で15時間反応^{注6)}させる。10分間煮沸して反応を止め，冷却後，1mol/L塩酸でpH4.5にした後，水を加えて全量を14mlとし，遠心分離（12,000回転/分，10分間）する。上澄み液7mlを分取して1mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH6.8に調整後，水を加えて全量を25mlとする。更に最終溶液中のパントテン酸の濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈し，試験溶液とする^{注5)}。

④ 測定

試験管 2 本ずつに試料溶液 0.5, 1.0 及び 2.0ml を正確に加え、次に試験管に測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。別に検量線作成のため、パントテン酸カルシウム標準溶液 (0~0.15 µg 相当量^{注8)}) を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。121℃で5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液 1 滴 (約 30 µl) ずつを無菌的に接種し、37℃で 18 時間程度ふ卵器に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600nm の濁度を用いて測定する^{注9)}。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のパントテン酸カルシウム量を求め、試料中のパントテン酸カルシウム含量を算出する。得られた値に係数 0.92 を掛けてパントテン酸量とする。

計算式

試料中のパントテン酸含有量 (mg/100g) = $A \times N \times V \times 100 / (W \times 1000 \times 1000)$

A: 検量線より算出した試験溶液中のパントテン酸含量 (ng)

V: 定容量 N: 希釈値 W: 秤取量 (g)

[注]

- 1) 片山化学 特級、または同等品を用いる。
- 2) ハト肝臓アセトンパウダー中にはパントテン酸関連化合物が含まれているため、あらかじめイオン交換樹脂処理によりこれを除去しておく必要がある。
- 3) 旧名称は、Lactobacillus arabinosus である。この菌は遊離パントテン酸にしか応答しないので、CoA (コエンザイムA) 関連化合物などの結合型パントテン酸はあらかじめハト肝臓アミダーゼとアルカリホスファターゼで分解処理して遊離型に誘導しておく必要がある。
- 4) パントテン酸定量用基礎培地「ニッスイ」: 日水製薬
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」: 日水製薬
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」: 日水製薬 (前培養培地に同じ)
- 5) 試料の均質性を確認出来れば、試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。

- 6) 酵素反応時間についてはデータを確認し、至適条件を設定することで変更することができる。
- 7) CoA 関連化合物などの結合型パントテン酸があまり多くない場合の試験溶液の調製は、パントテン酸の含有量に応じて以下の2種の簡易法のいずれかによっても良い。

① パントテン酸含有量が比較的少ない場合の簡易調製法

試料 2g^{注5)}を精秤して水 50ml を加え、1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8~7.0 に調整し、121℃で 15 分間オートクレーブで加圧抽出する。冷却後、2.5 M 酢酸ナトリウム溶液 2ml、タカジアスターゼ (三共 2500~5000unit/g) 100mg 及びババイン (和光純薬工業 Code No. 164-00172, Activity: 0.5unit/g) 100mg を加え、1mol/L 塩酸で pH4.5 にした後、トルエンを 2~3 滴加え、37℃で 24 時間酵素分解^{注6)}を行う。反応後、10 分間煮沸して酵素反応を停止し、冷却後、10% メタリン酸 0.3ml を加えて 100ml に定容し、ろ過する。ろ液 25ml を分取して 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、水を加えて 50ml に定容してろ過し、更に最終溶液中の濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈し、試験溶液とする。

② パントテン酸含有量が比較的多い場合の簡易調製法

パントテン酸カルシウムなどが添加されていてパントテン酸が高含量の場合には、単純に水で振とう抽出し、ろ過して得られるろ液を 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整し、試験溶液とする。この場合には、微生物定量法の他に紫外検出器付き高速液体クロマトグラフで定量する方法も適用できる。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長 210nm

カラム J'sphere ODS-M 80 (ワイエムシィ製) または同等品

移動相 0.01mol/L リン酸二水素カリウム-メタノール (95 : 5V/V)

流量 1.0ml/分

8) 予め標準溶液濃度と生育の相関範囲を確認しておく。必要であればデータを確認した上で標準溶液濃度を適宜変更することができる。

9) マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー(たとえば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型など)で濁度を測定することもできる。マイクロプレートを使用する場合は試験菌の調製や、標準溶液および試験溶液の濃度を調整し、培養は嫌気条件下で行う必要がある。

23 ビオチン

(1) 微生物定量法

① 試薬

・ビオチン標準溶液 : D-ビオチン標準品^{注1)} 20mg を 25% (V/V) エタノール溶液に溶かし、正確に 200ml とする。更に、水で希釈して 0.5ng/ml となるようにする。

・使用菌株 : *Lactobacillus plantarum*^{注2)} (ATCC 8014)

・ビオチン測定用培地 (1L 中, pH6.8±0.1)

カザミノ酸	14g
L-シスチン	400mg
DL-トリプトファン	200mg
硫酸アデニン	20mg
塩酸グアニン	20mg
ウラシル	20mg
塩酸チアミン	200 μg
リボフラビン	400 μg
パラアミノ安息香酸	200 μg
パントテン酸カルシウム	400 μg
ニコチン酸	1mg
塩酸ピリドキシン	800 μg
リン酸二水素カリウム	1g
リン酸一水素カリウム	1g
硫酸マグネシウム	400mg

- 硫酸第一鉄 20mg
- 硫酸マンガン 20mg
- 酢酸ナトリウム（無水） 20g
- グルコース 40g
- ・乳酸菌保存用培地（1L 中，pH6.8±0.1）
 - 酵母エキス 5.5g
 - ペプトン 12.5g
 - ブドウ糖 11.0g
 - リン酸一水素カリウム 0.25g
 - 硫酸第一鉄 5.0mg
 - リン酸二水素カリウム 0.25g
 - 酢酸ナトリウム（無水） 10g
 - 硫酸マグネシウム 0.1g
 - 硫酸マンガン 5.0mg
 - 粉末寒天 20.0g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている^{注3)}。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

② 接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し、35℃で20時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600nmにおける透過率が80～90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

③ 試験溶液の調製

試料 2g^{注4)}を精秤し、2mol/L あるいは 3mol/L 硫酸 25ml を加え、121℃で1時間オートクレーブで加圧分解する。冷却後、5mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH4.5 に調整後、水を加えて 100ml に定容し、ろ過する。ろ液 25ml を分取して 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、50ml に定容してろ過し、更に最終溶液中のビオチンの濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈し、試験溶液とする^{注5)}。

④ 測定

試験管 2 本ずつに試料溶液 0.5、1.0 及び 2.0ml を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。別に検量線作成のため、ビオチン標準溶液（0～0.75ng 相当量^{注6)}）を試験管 2 本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5ml 及び水を加えて全量を 5ml とする。121℃で5分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液 1 滴（約 30 μl）ずつを無菌的に接種し、37℃で18時間程度恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600nm の濁度を用いて測定する^{注7)}。標準溶液の濁度より検量線を作成し、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビオチン量を求め、試料中のビオチン含量を算出する。

計算式

試料中のビオチン含有量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$) = $A \times N \times V \times 100 / (W \times 1000)$

A: 検量線より算出した試験溶液中のビオチン含量 (ng)

V: 定容量 N: 希釈値 W: 秤取量 (g)

[注]

- 1) 関東化学 特級, または同等品を用いる。
- 2) 旧名称は, *Lactobacillus arabinosus* である。
- 3) ビオチン定量用基礎培地「ニッスイ」: 日水製薬
一般乳酸菌保存検出用培地「ニッスイ」: 日水製薬
一般乳酸菌接種用培地「ニッスイ」: 日水製薬 (前培養培地に同じ)
- 4) 試料の均質性を確認出来れば, 試料中の目的成分の濃度によって採取量は適宜変更することが出来る。
- 5) ビオチン含量の高い食品については, 水で振とう抽出し, ろ過して得られたろ液を 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整し, 試験溶液とすることもできる。また, この場合, ビオチンを紫外部吸収あるいは蛍光を有する誘導体に導いた後, 勾配溶出液体クロマトグラフ法で定量する方法も適用できるが, 詳細は下記の文献に譲る。
- 6) ~~予め標準溶液濃度と生育の相関範囲を確認しておく。必要であればデータを確認した上で標準溶液濃度を適宜変更することができる。~~
- 7) マイクロプレートを使用し, マイクロプレートリーダー (たとえば, 日本モレキュラーデバイス社製, スペクトラ MAX 型など) で濁度を測定することもできる。マイクロプレートを使用する場合は試験菌の調製や, 標準溶液および試験溶液の濃度を調整し, 培養は嫌気条件下で行う必要がある。

[文献]

- 1) Desbene, P. L., Coustal, S. and Frappier, F. : *Anal. Biochem.*, 128, 359 (1983)
- 2) 金沢良昭, 中野貴彦, 田中英樹: *日本化学会誌*, 434 (1984)
- 3) Yoshida, T., Uetake, A., Nakai, C. Nimura, N. and Kinoshita, T. : *J. Chromatogr.*, 456, 421 (1988)
- 4) 江口秀敏ほか, ビタミン, 64 (11), 653-658, 1990, マイクロプレートを用いたビオチン, ニコチンアミド及びパントテン酸の微生物学的定量

24 ビタミンA (レチノール, カロテン) 注1)

(1) 高速液体クロマトグラフ法: レチノール (ビタミンAアルコール)

① 機器, 試薬

- ・水酸化カリウム溶液: 粒状水酸化カリウム (特級) 60g を冷却しながら水を加えて溶解し, 正確に 100ml とする。
- ・弱活性アルミナ: 活性アルミナ^{注2)} 500g に水 50ml を滴下して加え, 振り混ぜて均一にし, 密栓, 一夜放置する。活性度を測定し, 一定の活性度^{注3)} のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。

- ・標準レチノール：パルミチン酸レチノール(1g中に30万 μ g以上のレチノールを含むもの)を次の試験法に従ってけん化抽出し、標準溶液の検定を行う。フリーのレチノールを使用する場合でもイソプロピルアルコール(特級)に溶解した後、標準溶液の検定を行う。
- ・ピロガロール，エタノール，塩化ナトリウム，石油エーテル(以上，特級)
- ・ヘキサン，酢酸エチル(以上，残留農薬試験用^{注4)})
- ・ジエチルエーテル：過酸化物を含まないもの。
- ・分光光度計：紫外部及び可視部の吸収が測定可能なもの。
- ・クロマト管：内径10mm，高さ250mm，ガラスコック付き
- ・高速液体クロマトグラフ：紫外分光光度計付き
- ・カラム：逆相分配型，内径4.6mm，長さ150mm

② 試験溶液の調製

1) けん化

試料約0.5 0.1~2g^{注4,5)}を60ml容遠心管(共栓付き)に精密に量り，3%ピロガロール-エタノール溶液^{注6)}10mlと水酸化カリウム溶液1mlを加え，70℃水浴中でガラス棒でときどきかき混ぜながら30分間加熱する。水冷後，1%塩化ナトリウム溶液22.5mlを加えた後，ヘキサン-酢酸エチル混液(9:1V/V)^{注6)}15mlを加える。5分間振とうし^{注7)}，遠心分離後，駒込ピペットで上層を100ml容なす形フラスコに移す。水層をヘキサン-酢酸エチル混液(9:1V/V)^{注6)}15mlで更に2回，同様に抽出する。抽出液を合わせ40℃で減圧濃縮する。

残留物をエタノールに溶解し，レチノールとして約0.3 μ g/ml濃度が検量線の範囲内となるように希釈し，試験溶液とする。

高速液体クロマトグラフによる測定において妨害成分の影響が出る場合は，レチノール含量が0.3mg/100g程度以下の試料の場合は，残留物を石油エーテル(特級)5mlに溶解し，以下に示すアルミナカラムを用いた精製を行う^{注5,8)}。

2) アルミナカラムクロマトグラフィー

クロマト管にあらかじめ活性度を調整したアルミナ約7gを石油エーテルに懸濁させ，約7cmの高さに充填する。受器に100ml容なす形フラスコを置き，カラムの上に先の残留物の石油エーテル溶液を静かに流し入れ，流量1ml/分で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル5mlを加え，更に3回繰り返す(カロテン画分)。次に，受器を別の100ml容褐色なす形フラスコに替える。石油エーテル-エーテル混液(9:1V/V)を約30ml流す。得られた溶出液を，40℃で減圧濃縮する(レチノール画分)。残留物に一定量のエタノールを加え溶解する。1ml中レチノール濃度が検量線の範囲内となるようにを約0.3 μ g含むようにエタノールで希釈し，試験溶液とする。

③ 標準レチノールの検定濃度測定

10~20mg程度を精密に量りとり，試料と同様に，②，1)の方法に従ってけん化抽出した標準レチノールをイソプロピルアルコールに溶解し，1ml中にレチノールとして2~3 μ gになるように希釈し，分光光度計で325nmの吸光度を測定する。次式により希釈した標準溶液のレチノール濃度を求める。

$$\text{レチノール } (\mu\text{g/ml}) = \frac{A}{100} \times 1830 \times 0.3$$

$$\text{レチノール } (\mu\text{g/ml}) = A/100 \times 1,830 \times 0.3$$

AA: 希釈した標準溶液の 325nm における吸光度 (対照: イソプロピルアルコール, 1cm セル)

④ 標準溶液の調製

標準レチノールをエタノールで 1ml 中 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 μg になるように希釈し^{注9)}, 標準溶液とする。

⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例^{注6)10)}

カラム: 内径 4.6mm, 長さ 150mm, ステンレス製^{注7)11)}

移動相: メタノール-水 (92:8V/V)

測定波長: 325nm^{注8)12)}

流量: 1.0ml/分

温度: 35℃

注入量: 20 μl

⑥ 測定

試験溶液の一定量 (例 20 μl) を高速液体クロマトグラフに注入し, レチノールのピーク面積または高さを測定し, あらかじめ同量の標準溶液 20 μl を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から試験溶液中の濃度を求め, これを用いて試料中のレチノール含量を算出する。

⑦ 計算

$$\text{試料中のレチノール含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times N \times \frac{100}{W}$$

$$\text{試料中のレチノール含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times N \times 100/W$$

C: 検量線から求めた試験溶液のレチノール濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

V: 定容量 (ml)

N: 希釈率

W: 試料採取量 (g)

(2) 吸光光度法: 総カロテン^{注9)13)}

① 試験溶液の調製

(1), ②と同様に操作し, アルミナカラムクロマトグラフィーで得られるカロテン画分^{注10)14)}を 40℃で減圧濃縮する。残留物を一定量のヘキサンに溶解し, 1ml 中にカロテンを約 1 μg 含むようにヘキサンで希釈する。

② 測定

分光光度計によりヘキサンを対照にして, 試験溶液の 453nm の吸光度を測定する。

③ 計算

β -カロテンの吸光係数 $E \cdot = 2,592$ (溶媒, ヘキサン) を用いて次式により試料中の含量を求める。

$$\text{試料中の総カロテン (mg/100g)} = A \times \frac{1000}{2592} \times \frac{V}{W} \times N$$

$$\text{レチノール当量 (\mu g/100g)} = \text{総カロテン (mg/100g)} \times \frac{1000}{2} \times \frac{1}{6}$$

$$\text{試料中の総カロテン (mg/100g)} = A \times 1,000/2,592 \times V/W \times N$$

$$\text{レチノール当量 (\mu g/100g)} = \text{総カロテン (mg/100g)} \times 1,000/2 \times 1/3$$

A : 試験溶液の吸光度

V : 定容量

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

(3) 高速液体クロマトグラフ法： α -カロテン、 β -カロテン^{注9-13)}、^{注4+15)}

① 機器、試薬

- ・ α -カロテン標準溶液： α -カロテン標準品^{注4-2-16)}
- ・ β -カロテン標準溶液： β -カロテン標準品^{注4-2-16)}
- ・シクロヘキサメン，イソプロピルアルコール（以上，特級）
- ・高速液体クロマトグラフ：紫外可視分光光度計付き
- ・その他の機器及び試薬は前記（1）と同様のものを用いる。

② 試験溶液の調製

（1），②，1）に従って操作し，得られた抽出物を減圧濃縮後，エタノールで溶解し， α -カロテン及び β -カロテン濃度が検量線の範囲内にとして2~4 μ g/mlになるように希釈し，試験溶液とする。

野菜またはジュースの場合は次の操作で試験溶液を得る。試料約2gを60ml容の遠心管（共栓付き）に精密に量り，3%ピロガロール含有エタノール^{注17)}溶液20mlと無水硫酸ナトリウム10gを加え，5分間振とうする。遠心分離後，上澄み液を100ml容メスフラスコにとる。残留物に3%ピロガロール含有エタノール^{注17)}溶液20mlを加え，同様に抽出を行う。同様の操作を更に1回繰り返した後，3%ピロガロール含有エタノール液で定容する。溶液の一部（10ml）を60ml容の遠心管（共栓付き）に正確に量り，60%水酸化カリウム溶液1mlを加え，70℃の水浴中で30分間加熱する。水冷後，1%塩化ナトリウム溶液23mlとイソプロピルアルコール6ml^{注18)}及びヘキサノール酢酸エチル混液（9：1V/V）^{注6)}15mlを加える。5分間振とうし，遠心分離後，駒込ピペットで上澄み液を100ml容のなす形フラスコに移す。水層をヘキサノール酢酸エチル混液（9：1V/V）^{注6)}15mlで更に2回，同様に抽出する。抽出液を合わせ40℃で減圧濃縮する。残留物をエタノールに溶解する。ただし，ニンジンジュースのように β -カロテン含量の高い場合はけん化操作を省略する^{注19)}。

③ 標準溶液の調製

- ・ α -カロテン標準品5mgを精密に量り，石油エーテルで100mlに定容し，標準溶液Aとする。
- 標準溶液Aをエタノールで希釈し， α -カロテンを1ml中に0.5，1.0，2.0及び4.0 μ g含む

溶液を調製し^{注9)}、 α -カロテン標準溶液とする。

・ β -カロテン標準品 20mg を精密に量り、シクロヘキサンで 100ml に定容し、標準溶液 B とする。標準溶液 B をエタノールで希釈し、 β -カロテンを 1ml 中に 0.5, 1.0, 2.0 及び 4.0 μ g 含む溶液を調製し^{注9)}、 β -カロテン標準溶液とする。

④ 標準溶液の検定濃度測定

③の標準溶液 A 2ml を正確に量り、石油エーテルで 100ml に定容し、444nm の吸光度を測定する。 α -カロテンの吸光係数を $E \cdot d = 2,800$ として標準溶液 A 中の α -カロテン濃度を求める。

③の標準溶液 B 2ml を正確に量り、シクロヘキサンで 200ml に定容し、455nm の吸光度を測定する。 β -カロテンの吸光係数を $E \cdot d = 25002,450$ として標準溶液 B 中の β -カロテン濃度を求める。

⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例^{注13,20)}

カラム：内径 4.6mm, 長さ 150mm, ステンレス製^{注14,21)}

移動相：メタノール-クロロホルム (96 : 4 V/V)

流量：1.5ml/分

測定波長：455nm

温度：40℃

注入量：20 μ l

⑥ 測定

試験溶液の一定量 (例 20 μ l) を高速液体クロマトグラフに注入し、 α -カロテン及び β -カロテンのピーク面積または高さをそれぞれ測定する。し、あらかじめ同量の標準溶液 20 μ l を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中の α -カロテン及び β -カロテン含量を求める。

⑦ 計算

$$\text{試料中の } \alpha\text{-カロテン (または } \beta\text{-カロテン) 含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times N \times \frac{100}{W}$$

~~試料中の α -カロテン (または β -カロテン) 含量 $(\mu\text{g}/100\text{g}) = C \times V \times N \times 100/W$~~

C : 検量線から求めた試験溶液の α -カロテン (または β -カロテン) 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

V : 定容量 (ml)

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

レチノール当量に換算する場合は次式による。

$$\text{レチノール当量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) = 1/24 \alpha\text{-カロテン含量 } (\mu\text{g}/100\text{g}) + 1/12 \beta\text{-カロテン含量 } (\mu\text{g}/100\text{g})$$

[注]

- 1) ビタミンは生物効力に対する名称である。定量の対象としては、主にビタミン A 効力を示すレチノール、 α -カロテン及び β -カロテンとし、その定量値はレチノール当量として表す。なお、レチノール 1 μ g は、 α -カロテン 24 μ g、 β -カロテン 12 μ g にそれぞれ相当す

る。

2) Merck Art. 1097 (メルク社製)

3) Yellow OB (FD & C Yellow No. 4, Colour Index No. 11390) 20mg を石油エーテル 100ml に溶解し、保存溶液とする。保存溶液 10ml を石油エーテルで 100ml とし試験溶液とする。弱活性アルミナを石油エーテルで懸濁し、カラムに 10cm の高さに詰める。

試験溶液 1ml をカラムに通し、石油エーテル-エーテル混液 (9 : 1) を流し、黄色がカラムから落ち切るまでの容量 (ml) をもって活性度の指標とする。通常、約 12ml で溶出する。

4) 同等性が確認できれば、特級でも使用可能である。

4.5) レチノール含量が低い試料の場合、試料採取量を 1~2g にする。その場合、3%ピロガロール含有エタノール液 10ml と水酸化カリウム溶液 1ml のほか、更に粒状水酸化カリウム 2~3g を加えてけん化する。なお、試料の均一性が確認できれば、採取量は適宜変更することは可能であるが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲に入る様にする。試料が生鮮食品の場合、そのまま粉碎するとビタミン A が分解する恐れがあるので、試料にピロガロールと水及び必要に応じエタノールを加え、均一化処理を行うとよい。また粉碎による試料の均一化が困難な場合も、生鮮食品の場合と同様に均一化処理を行ってから採取するか、試料採取量を増やして試験を行い、抽出容量も採取量に合わせてスケールアップするとよい。

6) ビタミン A の酸化防止のため、予めデータを確認した上で、酸化防止剤 (α -トコフェロール等) を添加するとよい。

7) 各抽出時にイソプロピルアルコールを 2ml ずつ加えると、レチノールの回収率向上に効果的である。予めデータを確認した上で実施すること。

5.8) アルミナカラムによる精製処理は、共存する妨害物の除去に効果的である反面、分析精度を低下させる。したがってレチノール含量が 0.3mg/100g 程度以下の試料であっても妨害物が少ない場合には、むしろこの処理を省略した方が良いこともある。

9) 予めデータを確認した場合には、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

6.10) レチノールには、多くの異性体が存在する。13-シス体は自然界に多く存在し、加熱処理によっても生じる。13-シス体は、all-トランス体に比べて生物効力は 75% と言われている。13-シス体を分別定量する場合は、順相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフ条件が適当である。しかし、標準の 13-シス-レチノールは得るのが難しく、不安定なので注意を要する。

7.11) Cosmosil Eonopae5C₁₈-MS-II (ナカライテスク製) あるいは相当品を用いる。

8.12) レチノールの測定に蛍光検出器を用いた例も報告されている。ここで、紫外外部吸収検出器を用いているのは、all-トランス体と 13-シス体は吸光係数が近似しており、13-シス体を含めたレチノール含量を求めるには都合がよいためである。

9.13) トマト加工品などリコピンを多く含む食品は、アルミナカラムクロマトグラフィーでリコピンとカロテンを分離することは困難である。高速液体クロマトグラフ法により、 α -カロテンと β -カロテンを分離・測定し、その合計を総カロテンとした方がよい。

10.14) 弱活性アルミナカラム処理では、カロテンの異性体 (α , β , γ) は分離しない

め、測定値は総カロテンとなる。なお、予めデータが確認できれば、弱活性アルミナカラムの代わりにディスポーザルカラム（例；Sep-Pak Cartridge Silica）を用いてカロテン画分を得ることも出来る。その場合、（1）、②、1）処理後の残留物をアセトン-ヘキサン混液（2:98 V/V） 4ml に溶解し、予めアセトン-ヘキサン混液（2:98 V/V） 5ml でコンディショニングした Sep-Pak Cartridge Silica に流し入れ、カラム上部の液がなくなる直前にアセトン-ヘキサン混液（2:98 V/V） 3ml を加え、更に1回繰り返す。溶出液を合わせ、カロテン画分とする。

1-1-15) クリプトキサンチンのように α -カロテン、 β -カロテン以外の成分でビタミンA効力を有するものを多く含む食品にあっては、それらの成分も分離・測定してレチノール当量に合算する。クリプトキサンチンの高速液体クロマトグラフの条件は、（3） 高速液体クロマトグラフ法：総カロテン、 α -カロテン、 β -カロテンに同じである。クリプトキサンチンは、フナコシ 82-0003-17（EXTRASYTESE 社製）あるいは相当品を用いる。濃度はクリプトキサンチンを石油エーテルに溶解し、452nm の吸光度を測定し、 $E \cdot d = 2.386$ を用いて検定する。濃度を算出する。検量線作成用の標準溶液は、濃度決定検定に用いた標準溶液を分取し、溶媒留去後、エタノールの一定量に溶解し、クリプトキサンチンを 1ml 中に 0.5、1.0 及び 2.0 μg 含むように調製する。予めデータを確認した場合には、なお、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。

なお、クリプトキサンチンの生物効力については、24 μg がレチノール 1 μg に相当するとするのが一般的である。

1-2-16) α -カロテン標準品は和光純薬工業製 035-17981 あるいは相当品を及び β -カロテン標準品には、Merck Art2236（メルク社製）あるいは相当品を用いる。

17) 試料マトリックスによってはエタノールの代わりにヘキサン-アセトン-エタノール-トルエンの混液（10：7：6：7 V/V/V/V）を用いると、カロテンの溶解性が高まり回収率が良い場合がある。

18) 予め、データが確認できれば、カロテンの回収率を向上させるために抽出時にイソプロピルアルコールを 2ml 程度ずつ加えるとよい。

19) カロテンを強化した食品のように夾雑物の懸念がない試料であれば、けん化操作を省略しエタノールに溶解させて、直接高速液体クロマトグラフで測定することが出来る。その際、エタノールに代えてクロロホルムやヘキサン-アセトン-エタノール-トルエンの混液（10：7：6：7 V/V/V/V）を用いるとカロテンの溶解性が高まり、回収率が向上する場合がある。使用する場合は予めデータを確認すること。

1-3-20) （3）、⑤の高速液体クロマトグラフ操作条件では α -カロテンと β -カロテンの分離とともに、 β -カロテンのシス体も分離する。シス体の β -カロテンはニンジンや藻類の抽出物中に多量に存在しているため、ここでは 9-シス体と 13-シス体のピーク面積値を all-トランス体の面積値に合わせて β -カロテン値とする。また、クロマトグラムの再現性が悪いときは移動相にパルミチン酸アスコルビル又は α -トコフェロール等を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で加えると改善される。

1-4-21) TSKgel ODS 120 A（東ソー製）あるいは相当品を用いる。リコピンを多く含むものはアセトニトリル-メタノール-テトラヒドロフラン（55：40：5 V/V/V）（ α -トコフェ

ロールを 50 $\mu\text{g/ml}$ 含む。) を使用した方がよい。

[参考文献]

- 1) 大森正忠, 武藤泰敏: “ビタミンハンドブック, ③ビタミン分析法”, 日本ビタミン学会編, 1, 化学同人(1989)
- 2) 勝井五一郎: “ビタミン学実験法 [I]”, 日本ビタミン学会編, 14, 東京化学同人 (1983)
- 3) Quakenbush, F. W. : J. Liq. Chrom., 10, 643 (1987)
- 4) 月田潔: ビタミン, 58, 185 (1984)
- 5) 氏家隆, 飯田栄子, 小高要, 新藤寛美, 上野順士: ビタミン, 64, 187 (1990)

25 ビタミン B₁^{注1)}

(1) 高速液体クロマトグラフ法^{注2)}

① 機器, 試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC): 蛍光検出器付き
- ・反応ポンプ^{注3)}
- ・カラム: 逆相分配型, 内径 4.6mm, 長さ 150mm
- ・標準ビタミン B₁: 国立衛生試験所日本薬局方標準品「チアミン塩酸塩標準品」「チアミン塩化物塩酸塩標準品」
- ・酢酸緩衝液 (pH4.5): 4mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40ml, 50%酢酸溶液 20ml を水 2L に溶解し, 必要に応じてろ過又は遠心分離して, その上澄み液を使用する。
- ・酵素溶液^{注4)}: 酵素^{注5)} ビタミンB※1※ 定量用タカジアスターゼB 0.5g を酢酸緩衝液 (pH4.5) 10ml に用時溶解し, ろ過又は遠心分離して, その上澄み液を使用する。
- ・パームチット: 活性ビタチェンジ (吸着剤) ビタミン B₁ 定量用
- ・0.01mol/L リン酸二水素ナトリウム—0.15mol/L 過塩素酸ナトリウム溶液 (pH2.2): リン酸二水素ナトリウム (無水, 特級) 2.4g, 過塩素酸ナトリウム (無水, 特級) 36.7g に水を加えて溶かし 2L とし, する。pHメーターを用い, 過塩素酸で pH2.2 に調整する。
- ・25%塩化カリウム—0.1mol/L 塩酸溶液 (脱着液): 濃塩酸 8.5ml を 25%塩化カリウム溶液 1L に加える。
- ・0.01%フェリシアン化カリウム—15%水酸化ナトリウム溶液: フェリシアン化カリウム (特級) 10mg を 100ml 容褐色メスフラスコに量りとり, 15%水酸化ナトリウム溶液を加えて 100ml とする。用時ごとに調製する。
- ・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。
- ・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試験溶液の調製

試料 (40.1~10g)^{注6)} を 100ml 容抽出瓶^{注7)} に精密に量り取る。これに 0.1mol/L 塩酸 50ml を加え, 30 分間 煮沸沸騰水浴中で加熱し, ときどきかくはんしながら抽出する^{注8)}。50℃以下に冷却し, 4mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0~4.5 とする。酵素溶液 5ml を加え^{注9)}, 37~40℃で一夜保温後, 酢酸緩衝液 (pH4.5) で全量を 100ml とし, ろ過後, 酢酸緩衝液 (pH4.5) で適宜希釈したものを試料溶液とする^{注10)}。なお, 高速液体クロマトグラフによる測定において妨害成分

の影響がある場合は以下の精製を行う。

水を用いて活性ビタチェンジ(1.5g)を詰めたカラム^{注11)}に、試料溶液の適当量(ビタミンB₁ 4~5μg以内を含有)を正確に注ぎ、流量1ml/分で吸着させる。吸着管内壁を水5mlで洗い、次に沸騰水30~60mlでカラムを洗った後、沸騰した脱着液を1秒1滴(3ml/分)で流し、溶出液約25mlを分取する。室温にもどし、脱着液で25ml定容とし、HPLC用試験溶液とする。

③ 標準溶液の調製

1) 標準原液

標準ビタミンB₁を105℃で2時間乾燥^{注12)}、30分間デシケーター内で放冷後、1L容の褐色メスフラスコに100mgを精密に量り、1mol/L塩酸50mlを加えて溶解した後、水で定容する(100μg/ml、冷暗所で6か月は安定、6か月おきに^{注13)}調製する。)

2) 標準溶液

標準原液5mlを500ml容の褐色メスフラスコに正確に量り、0.1mol/L塩酸で定容する(1μg/ml、1か月おきに^{注13)}調製し直す。)

3) HPLC用標準溶液

標準溶液を加熱済み25%塩化カリウム-0.1mol/L塩酸溶液(以下、脱着液)で希釈し、HPLC用標準溶液(例：0.1, 0.05, 0.02μg/ml)とする^{注14)}。~~0.1, 0.05及び0.02μg/mlとする~~

④ 測定

HPLC用試験溶液の一定量(例20μl)を高速液体クロマトグラフに注入し^{注4)15)}、ビタミンB₁のピーク面積または高さを測定し、あらかじめ同量のHPLC用標準溶液20μlを高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のビタミンB₁含量を求める。

⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

カラム：内径4.6mm、長さ150mm、ステンレス製^{注5)16)}

移動相：[0.01mol/Lリン酸二水素ナトリウム-0.15mol/L過塩素酸ナトリウム混液(pH2.2)] - メタノール(9：1V/V)

検出器：蛍光分光光度計^{注6)17)}

測定波長：励起波長375nm、蛍光波長440nm

流量：0.8ml/分

反応液：0.01%フェリシアン化カリウム-15%水酸化ナトリウム溶液0.4ml/分^{注7)18)}

反応管：内径0.8mm、長さ100cm

注入量：20μl

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミンB}_1\text{含量 (mg/100g)} = C \times V \times \frac{V''}{V'} \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

$$\text{試料中のビタミンB}_1\text{含量 (mg/100g)} = C \times V / V' \times 25/5 \times N \times 100/W \times 10^{-3}$$

C：検量線から求めたビタミンB₁濃度(μg/ml)

V：定容量(ml)

V'：カラム吸着液量(ml)

V''：カラム溶出液量(ml)

N：希釈率

W：試料採取量(g)

[注]

1) 食品添加物として許可されているビタミンB₁類のうち、ジベンゾイルチアミン、ビスベンチアミン、チアミンセチル硫酸塩、チアミンチオシアン酸塩、チアミンナフタレン-1,5-ジスルホン酸塩及びチアミンラウリル硫酸塩を含む試料については、本試験法では回収不足となる可能性がある。検出できない。これらの成分を含む場合は、以下の(3)の方法で試験する必要がある。定量する場合は、それぞれ異なる試験溶液の調製法が必要となる。

また、ヒドロキシエチルチアミン(HET)のように生体内のピルビン酸代謝の中間体で生体チアミンの一形態として存在するものもある。HETは総チアミンの概念に含まれるため、HETを同時に分離定量し、チアミン塩酸塩へ換算してビタミンB₁としての合計量を求める。なお、フェリシアン化カリウムによるチオクローム蛍光法では、HETとチアミンは分別不能であるがとの合計量として求めることができる。

2) 高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンB₁リン酸エステルのそれぞれに対応するチオクロームを生成させるポストカラム定量法がある。しかし、食品中のビタミンB₁リン酸エステルはすべて遊離のビタミンB₁になってから吸収されるため、酵素分解ですべて遊離のビタミンB₁とした後、ポストカラム法を用いて定量する。別の方法として、ブロムシアンないしフェリシアン化カリウムでチオクロームとし、溶媒抽出して高速液体クロマトグラフに注入し、この蛍光を測定するプレカラム法もある。反応ポンプを必要としない長所を持つが、試料により反応率に影響を受ける欠点がある。

3) 送液する反応液中のフェリシアン化カリウムが還元されてしまうことを避けるため、金属製のラインフィルターなどを使用しないこと。

4) 使用する酵素の活性(力価)により、酵素溶液の濃度及び添加量を調整する。また、使用する酵素についてビタミンB₁及びビタミンB₂の残存の有無を確認し、入っている場合はブランク値を差し引くか、酵素溶液を精製する。(例えば、ビタミンB₁ではパームチット(陽イオン交換樹脂)とともに酵素溶液を攪拌した後、遠心分離し、その上澄を用いる等)

5) 例えばタカジアスターゼB又はその同等品(フォスファターゼ活性を有するもの)

6) 試料が生鮮食品の場合、そのまま粉碎するとビタミンB₁が分解する恐れがあるので、試料に0.1mol/L塩酸溶液または20%メタリン酸溶液加えてミルで均一化処理を行うとよい。また粉碎による試料の均一化が困難な場合も上記生鮮食品の場合と同様に均一化処理を行ってから採取するとよい。試料の均一性が確認できれば、採取量は適宜変更することが可能であるが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲に入るようにする。

3-7) 褐色ガラス製で、容量100mlに刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーとメスフラスコを代りに用いてもよい。

8) 酸抽出時の酸化防止のためには、チオ尿素を0.1%程度添加するとよい。また試料が油脂類やソフトカプセル剤の場合は、0.3%程度の乳化剤(例えばTween80)を加えることで抽出が改善する場合がある。

9) 試料中にビタミンB₁リン酸エステルを含まないかまたは無視できる場合は酵素分解を省略してもよい。

10) 試料に含有する物質(例えばタンニン等)の影響により、チアミンが抽出残渣に吸着し正確

に定量が行えない場合は、酵素反応後の試験溶液に塩酸を加え pH を 1 付近にした後、ろ過することで改善する場合がある。また、海藻を多く含む試料では、酵素反応後、濃塩酸 2ml を程度加え、沸騰水中にて再加熱することで抽出不足を回避できる場合がある。

1 1) 予めデータを確認することで、精製操作にディスポーサブルミニカラムを用いることも可能である。

1 2) 標準ビタミン B₁ の水分を測定して、標準溶液の濃度を補正することも可能である。

1 3) 保存期間及び温度条件については、予め標準溶液の安定性データを確認できれば変更することが可能である。

1 4) 予めデータを確認し、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能である。なお、精製操作により試験溶液の溶媒組成が変わる場合には、標準溶液の希釈溶媒の組成をその組成に合わせることを。

4 1 5) ためし打ちなどをして、検量線の濃度範囲内に標準溶液 0.1 μg/ml と同じくらいになるように希釈を考える。ただし、パームチットカラム負荷のときの吸着絶対量は約 10 μg なので、4 倍以上の希釈を必要とする場合はもう一度パームチットカラムからやり直して値を比較する。

5 1 6) L-column ODS Cosmosil C₁₈ Econopac (ナカライテスタ製) [財団法人 化学物質評価研究機構] あるいは相当品を用いる。

6 1 7) 感度を向上させるためには検出器のセル容量の大きいものがよい (例えば 12 μl)。

7 1 8) 水酸化ナトリウムの濃度は、1~20% の範囲では高いほどよいが、反応管内の詰まりを防ぐため 15% にしている。フェリシアン化カリウム濃度は、反応ポンプにより、最適濃度が異なるので、適宜変更すること (例 0.001~0.05%)。0.001~0.01% で高い感度を示す。試薬の安定性から 0.01% にしている。反応温度は、30~50℃ で差がない。反応管をカラムオープン内に入れ、カラムと同じ温度で行うと便利である。

分析終了後は必ず反応ポンプ、HPLC 側ポンプとも 30 分以上水洗する。終了後、カラムをメタノールなどで置換しておく。

[参考文献]

1) 氏家隆, 都竹由起子, 森田公平, 田村マリ, 小高要: ビタミン, 64, 379-385 (1990)

(2) チオクローム法

① 機器, 試薬

・蛍光光度計: 励起波長 360nm, 蛍光波長 435nm で測定可能なもの。

・試薬は (1) と同様のもの, また, 特に指定のない限り特級を用いる。

② 試験溶液の調製

(1), ② と同様に操作し, ビタチェンジカラム溶出液を試験溶液とする。

③ 標準溶液の調製

標準ビタミン B₁ を 0.1mol/L 塩酸で 1 μg/ml となるように調製する。

④ 測定

試験溶液 5ml を 3 本の試験管にとる (a, b, c)。a には標準溶液 (1 μg/ml) 1ml を加え, b 及び c には水 1ml を加える。a 及び b に 1% フェリシアン化カリウム液 0.3ml を加え, c には水 0.3ml を加える。次に, 各試験管に 30% 水酸化ナトリウム溶液 3ml を加え, よく振り混ぜる。

次に、ベンゼン-ブタノール (75 : 25V/V) 15ml を加え、1分間よく振り混ぜた後、分離した有機溶媒層をとる。これに無水硫酸ナトリウム約 2g を加え、脱水後、有機溶媒層の蛍光を測定する。励起波長 360nm、蛍光波長 435nm で a の蛍光光度計の目盛りを 100% とし、b 及び c を測定し、試料中のビタミン B₁ 含量を求める。

⑤ 計算

$$\text{試験溶液 5ml 中のビタミン B}_1 \text{量 } (\mu\text{g}) = \frac{b-c}{a-b}$$

$$\text{試料中のビタミン B}_1 \text{含量 (mg/100g)} = C \times \frac{V}{V'} \times \frac{V''}{5} \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

$$\text{試験溶液 5ml 中のビタミン B}_1 \text{量 } (\mu\text{g}) = (b-c)/(a-b)$$

$$\text{試料中のビタミン B}_1 \text{含量 (mg/100g)} = C \times V/V' \times 25/5 \times N \times 100/W \times 10^{-3}$$

C : 試験溶液 5ml 中のビタミン B₁ 量 (μg)

V : 定容量 (ml)

V' : カラム吸着液量 (ml)

V'' : カラム溶出液量 (ml)

N : 希釈率

W : 試料採取量 (g)

(3) 高速液体クロマトグラフ法(ジベンゾイルチアミン等を含む総ビタミン B₁ 定量法)^{注1)}

① 機器, 試薬

・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 流路切替バルブ, 蛍光検出器付き

・反応ポンプ : (1) と同様のもの。

・試薬は (1) と同様のもの。また、特に指定のない限り特級を用いる。

・塩酸-エタノール溶液 : 濃塩酸 9.5ml にエタノール 700ml を加え、さらに水を加えて 1L とする。

・システイン-エタノール溶液 : L-システイン塩酸塩一水和物 350mg に、塩酸-エタノール溶液を加え 50ml とする。

② 試験溶液の調製

試料 0.1~5g^{注2)} を 100ml 容褐色ガラス抽出瓶に採取し、抗酸化剤として 10%チオ尿素水溶液を 1ml 添加し、酢酸緩衝液 (pH4.5) を 5~15ml 加えて混合後、pH を 4.5 に調整する。そこへ、酵素溶液 3ml を正確に加え、37~40℃ で一夜、酵素分解を行う。次に、エタノール 70ml 及び 2mol/L 塩酸溶液 5ml を加え、恒温水槽中で 70℃, 30 分間攪拌しながら加温抽出を行った後、冷却後イオン交換水で 100ml に定容し、ろ過後、塩酸-エタノール溶液で適宜希釈した液を試験溶液とする。

③ 標準溶液の調製

1) 標準原液

(1) と同様のものを使用する。

2) HPLC 用標準溶液

標準原液を塩酸-エタノール溶液で希釈し、HPLC 用標準溶液 (例 : 1.0, 0.1, 0.02, 0.002 μg/ml) とする^{注3)}。

④ 測定

HPLC 用標準溶液及び試験溶液を 5ml 共栓つき試験管に正確に分取し、システイン-エタノール溶液 1ml 及び 4mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 1ml を正確に加え、30 分間室温にてアルカリ分解を行う。その後、4mol/L 塩酸 1ml を加え、HPLC 用標準溶液及び HPLC 用試験溶液とする。高速液体クロマトグラフは、イオン交換水で陽イオン交換カラム(前処理カラム)にチアミンを吸着させ精製し、流路バルブを切り替え、移動相で溶出するカラムスイッチングの手法を用いる^{注4)}。HPLC 用試験溶液を一定量(例 20 μ l)高速液体クロマトグラフに注入し^{注5)}、ビタミン B₁ のピーク面積又は高さを測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のビタミン B₁ 含量を求める。

⑤ 高速液体クロマトグラフ操作条件例

分析用カラム：L-column ODS, ϕ 4.6mm \times 25cm [財団法人 化学物質評価研究機構]

前処理用カラム：カプセルパック MF カートリッジ SCX, ϕ 4.0mm \times 1cm [資生堂株式会社]

前処理及び分析カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：溶液 0.15mol/L 過塩素酸ナトリウム含有 0.01mol/L リン酸二水素ナトリウム緩衝液 (pH2.2) 及びメタノールの混液(95:5 V/V)

流量：1.0ml/分

蛍光励起波長：375nm 蛍光測定波長：440nm

反応液：0.01%フェリシアン化カリウム含有 15%水酸化ナトリウム溶液^{注6)} 0.5ml/分

注入量：20 μ l

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン B}_1 \text{ 含量 (mg/100g)} = C \times V \times N \times \frac{100}{W} \times 10^{-3}$$

C：検量線から求めたビタミン B₁ 濃度 (μ g/ml)

V：定容量 (ml)

N：希釈率

W：試料採取量 (g)

[注]

1) ビタミン B₁ の分析では酵素による加水分解を行うが、その代表的酵素であるタカチアスターゼ B はリン酸結合型のチアミンを遊離型にするだけでなく、ジベンゾイルチアミン及びビスベンチアミンに対しても作用し、ベンゾイル基を切断するが不完全である。ジベンゾイルチアミン等が添加された試料中の総ビタミン B₁ 量を求める場合、予めデータが確認できた場合には本試験法で測定する必要がある。を用いることが出来る。

2) 試料が生鮮食品の場合、そのまま粉砕するとビタミン B₁ が分解する恐れがあるので、試料に 0.1mol/L 塩酸溶液または 20%メタリン酸溶液加えてミルで均一化処理を行うとよい。また粉砕による試料の均一化が困難な場合も上記生鮮食品の場合と同様に均一化処理を行ってから採取するとよい。試料が均一で、予めデータが確認できれば、採取量は適宜変更することが可能であるが、最終溶液中の濃度が検量線の範囲に入るようにする。

3) 予めデータを確認し、検量線の直線性が確認できれば、標準溶液の濃度範囲は適宜変更可能