

平成 15 年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究
主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

・水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

1. ビタミン B₁

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使ったビタミン B₁ の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中のチアミン測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.1 M HCl

Hydrochloric Acid = 36.46

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

[Assay 35.0 ~ 37.0%, 比重 1.18]

$1180 \times 36 / 100 = 424.8 \text{ g} \dots 1\text{L}$ に含まれる塩酸量

$424.8 / 36.5 = 11.6 \text{ mol / L} \dots 1\text{L}$ に含まれる

塩酸のモル濃度

HCl を 1ml 取り, 超純水を 115ml 加えてよく混和した。

ビタミン B₁ 標準溶液 (冷蔵保存)

Thiamin Hydrochloride = 337.27

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

1) 1 mg/ml のビタミン B₁ 標準溶液を作成。

C₁₂H₁₇ClN₄OS・HCl を 10 mg 秤量し,
0.1M HCl 10 ml に溶解した。

2) 0.01 mg/ml のビタミン B₁ 標準溶液を作成。

1) を 0.1 ml 取り 0.1M HCl 9.9 ml 加えて
100 倍希釈し, よく混和した。

3) 0.1 M HCl を対照として, 2) の吸光度を測定し, $\epsilon_{246\text{nm}} = 14200$ より正確な濃度を求め, これを標準液とした。(図 1)

移動相

0.2 M NaH₂PO₄

Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate = 156.01

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$156.01 \times 0.2 \times 1 = 31.202 \text{ g}$

NaH₂PO₄・2H₂O を 31.202 g 秤量し, 超純水 800ml くらいに溶解して, 1L にメスアップし, よく混合した。これを 2 度繰り返し, 2 L 作成した。

反応液

0.01% K₃ [Fe (CN)₆]

Potassium Hexacyanoferrate ()

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

K₃ [Fe (CN)₆] = 329.25

$500 \times 0.01 / 100 = 0.05 \text{ g}$

K₃ [Fe (CN)₆] を 0.05 g 秤量して, 500 ml に溶解してよく混合した。

15% NaOH

NaOH = 40.00 (Assay min. 96.0%)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$500 \times 15 / 100 = 75.0 \text{ g}$

NaOH を 75 g 秤量してビーカーに入れ, ガラス棒でよく混和しながら, 425 ml の超純水を少しずつ加えて溶解した。(このとき刺激臭と熱を発するので, ドラフト内で氷水で冷やしながらかけた。)

1-2. 試料調製方法

尿を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 試料調製のための操作方法を図 2 に示した。

1-3. 測定条件

移動相: 0.2M NaH₂PO₄

L-6000 Pump HITACHI

流速: 1.0ml/min PRESSURE: 19kgf/cm²

反応液 1: 0.01% K₃Fe (CN)₆

L-7100 Pump HITACHI

流速: 0.15ml/min

PRESSURE: 0kgf/cm²

反応液 2: 15% NaOH

LC-9A Pump SHIMADZU

流速: 0.15ml/min

PRESSURE: 1kgf/cm²

反応コイル: PEEK チューブ (外径 1.80 mm ; 内径, 0.50 mm ; 長さ, 1200 mm) .

カラム: Shodex Rs-pak NN-614 (φ6.0×150mm)

カラム温度: 40

検出器: RF-550 SHIMADZU

検出方法： 蛍光法

(励起波長 365nm, 蛍光波長 435nm)

他の機器： L-7200 Auto sampler HITACHI
C-R8A CHROMATOPAC
SHIMADZU

測定装置の概略を図3に示した。

1-4. 計算方法

1) 2.916×10^{-5} M の Thiamin Hydrochloride を流し, 20 μ l インジェクトした。(0.583nmol インジェクトした。)そして, 1nmol 当たりの AREA を計算した。[1200000 前後 / nmol] (図4)

2) 試料の検出 AREA / 1nmol 当たりの AREA $\times$ 24 時間尿の全量 (ml) / 0.02 (ml)
= _____ nmol / day
0.02 ml = 試料注入量

例)

1. ラット尿 (図5)

$590364 / 12924083 \times 25 / 0.02 = 57.10$ nmol / day

2. ヒト尿 (図6)

$107184 / 12289446 \times 10 / 9 \times 725 / 0.02$

$= 351.3$ nmol / day

$10 / 9 = (\text{尿 } 8.1\text{ml} + \text{HCL } 0.9\text{ml}) / (\text{尿 } 8.1\text{ml})$

サンプル作成時の塩酸処理

2. HPLC による糞中チアミン測定方法

2-1. 試薬作成方法

10% メタリン酸溶液

Metaphosphoric Acid, Lump Assay 37.0% (as HPO_3) (和光純薬工業株式会社)

40.54 g を超純水に溶かし, 150ml にメスアップした。

$10 \times 100 / 37 \times 150 / 100 = 40.540$ (g)

3% メタリン酸溶液

Metaphosphoric Acid, Lump Assay 37.0% (as HPO_3) (和光純薬工業株式会社)

16.21 g を超純水に溶かし, 200ml にメスアップした。

$3 \times 100 / 37 \times 200 / 100 = 16.216$ (g)

以下, 尿中チアミン測定と同じ試薬を使用した。

2-2. 試料調製方法

糞を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図7に示した。

2-3. 測定条件

尿の測定条件と同様

2-4. 計算方法

1) 標準を流し, 1nmol 当たりの AREA を計算した。[AREA 1200000 前後 / nmol]

2) 試料の検出 AREA $\times$ 希釈倍数 / 1nmol 当たりの AREA $\times$ 上清量 (ml) / 0.02 (ml) $\times$ 1 日の糞量 (g) / 処理に用いた糞量 (g)
= _____ nmol / day

例) ラット糞 (図8)

$(22373 \times 5) / 12924083 \times 3.2 / 0.02 \times 0.528 / 0.1063 = 6.88$ nmol / day

3. HPLC による肝臓中, 血液中のチアミン測定方法

3-1. 試薬作成方法

1.5% EDTA 溶液

2NA (EDTA-2Na) (和光純薬工業株式会社)

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 372.24$

EDTA-2Na を 0.15g 秤量し 10ml にメスアップして, 1.5% EDTA 溶液を作成した。

5% TCA 溶液

Trichloroacetic Acid = 163.39

(和光純薬工業株式会社)

TCA 10.0g を秤量し, 超純水を 160ml 加えて溶解し, 200ml にメスアップした。

4M 酢酸ナトリウム

Acetic sodium = 136.08

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$136.08 \times 4 \times 0.05 = 27.216$

酢酸ナトリウムを 27.216 g 秤量し, 超純水 40ml に溶解し, 50ml にメスアップした。

タカジアスターゼ B 溶液

タカジアスターゼ B [ビタミン B₁ 定量用]

(三共株式会社)

Vitachange, Activated [ビタミン B₁ 定量用]

(和光純薬工業株式会社)

1) タカジアスターゼ B を 0.2g 秤量し, 超純水 10ml に溶解した。

2) 活性ピタチェンジを 0.2g 秤量し, 超純水 10ml に溶解した。

3) 1) を 500 μ l エッペンに入れ, そこへ 2) を 500 μ l 加え, 1% タカジアスターゼ B 溶液を作成した。(この時 2) は攪拌しながらピペットで採取した。)

4) アルミ箔でまわりを覆い, 30 分間振とうした。[MODEL 2330 WAKENYAKU CO., LTD. 使用]

5) 遠心分離 (10000rpm, 10min, 4) した。

6) 5) の上清をエッペンに移し, この液をピ

タミン B₁ 測定前処理用タカジアスターゼ B 溶液とした。

以下，尿中チアミン測定と同じ試薬を使用

3-2．試料調製方法

生体試料を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図 9 に示した。

3-3．測定条件

尿の測定条件と同様

3-4．計算方法

血液中

- 1) 標準を流し，1nmol 当たりの AREA を計算した．[1200000 前後 / nmol]
- 2) 試料の検出 AREA / 1nmol 当たりの AREA × 250 / 20×600 / 200×1000 / 200 = _____ nmol/ml
250 μl・・・上清 200 μl + 4 M 酢酸 Na 30 μl + 1%タカジアスターゼ B 溶液 20 μl 20 μl・・・インジェクション量
600 μl / 200 μl・・・血液 200 μl + 5% TCA400 μl のうちの上清 200 μl
1000 / 200 μl・・・血液 1ml に換算

例) ラット血液 (図 10)

$$52042/12531343 \times 250/20 \times 600/200 \times 1000/200 = 0.78 \text{ nmol / ml blood}$$

肝臓中

- 1) 標準を流し，1nmol 当たりの AREA を計算した．[1200000 前後 / nmol]
- 2) 試料の検出 AREA / 1nmol 当たりの AREA × 250 / 20×5150 / 200×1.0 / 0.5 = _____ nmol / g of liver
- 3) _____ nmol / g of liver × 肝臓重量 g = _____ nmol / liver
5150 μl・・・肝臓 0.5g + 5% TCA 5.0ml のホモジネート 5.15 ml (5150 μl)
200 μl・・・上清
1.0 / 0.5g・・・肝臓 1g に換算

例) ラット - 肝臓 (図 11)

$$668173/12531343 \times 250/20 \times 5150/200 \times 1.0/0.5 = 34.32 \text{ nmol / g of liver}$$

4．HPLC による食品中のビタミン B₁ 測定方法

4-1．試薬作成方法

80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) (冷蔵保存)

Acetic Acid 99.7% (和光純薬工業株式会社，特級試薬)

- 1) 4M 酢酸ナトリウム 20 ml を 800 ml の超純水に溶解させ，酢酸を約 5 ml 加えて pH 4.5 に合わせた。

- 2) 1) に超純水を加え，1 L に定容した。

2.5%タカジアスターゼ B 溶液 (遮光，用事調製)

タカジアスターゼ B (ビタミン B₁ 定量用) (三共株式会社)

褐色瓶にタカジアスターゼ B を 2.5 g 秤量し，97.5 ml の 80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 [pH 4.5] に溶解させた。

以下，尿中チアミン測定と同じ試薬を使用

4-2．試料調製方法

食品を用いた時のビタミン B₁ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図 12 に示した。

4-3．測定条件

尿の測定条件と同様

4-4．計算方法

- 1) 標準を流し，1nmol 当たりの AREA を計算した．[1200000 前後 / nmol]
- 2) 試料の検出 AREA / (標準 1nmol 当たりの AREA) × 50ml / 0.02ml × (試料の全量) / (秤量した試料の重さ) = _____ a _____ nmol / 食事 1 食分
_____ a × 337.27 × 10⁻⁶ = _____ mg / 食事 1 食分
50 ml = 全量，0.02 ml = 注入量，
337.27 = チアミン塩酸塩の分子量

例) 食事中

$$42200/12623907 \times 50/0.02 \times 428.34/3.1306$$

$$= 1143.46 \text{ nmol / 食事 1 食分}$$

$$1143.46 \times 337.27 \times 10^{-6} = 0.386 \text{ mg / 食事 1 食分}$$

B．健康危険情報

特記する情報はない。

C．研究発表

- 1．論文発表
なし

- 2．口頭発表
なし

D．知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1．特許予定
なし
- 2．実用新案登録

なし
3. その他
なし

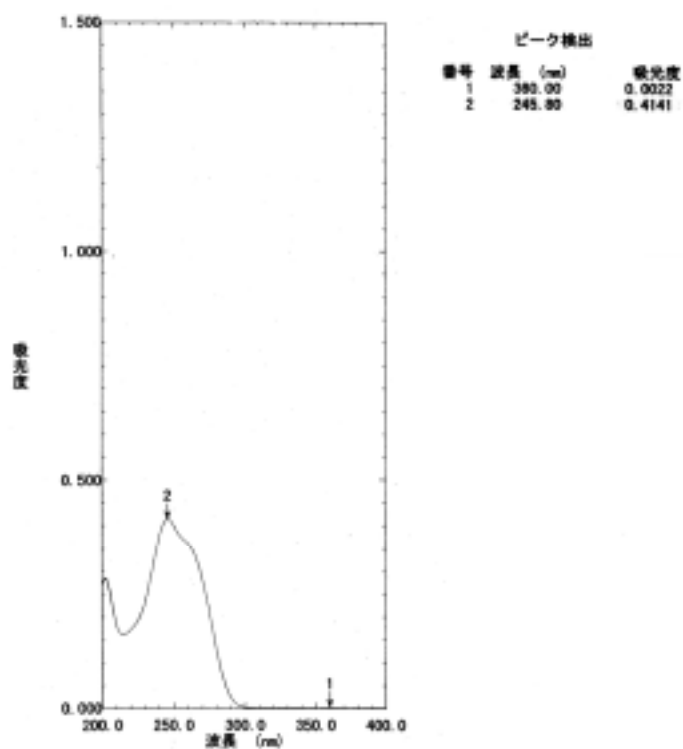


図1. チアミンの UV スペクトラム

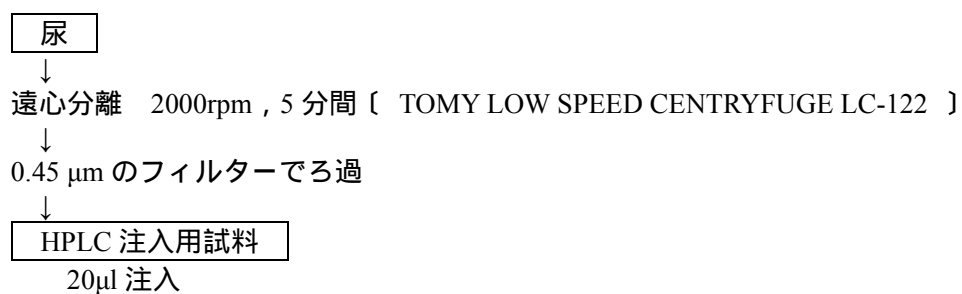


図2. 尿中チアミン測定のための HPLC 用試料の調整方法

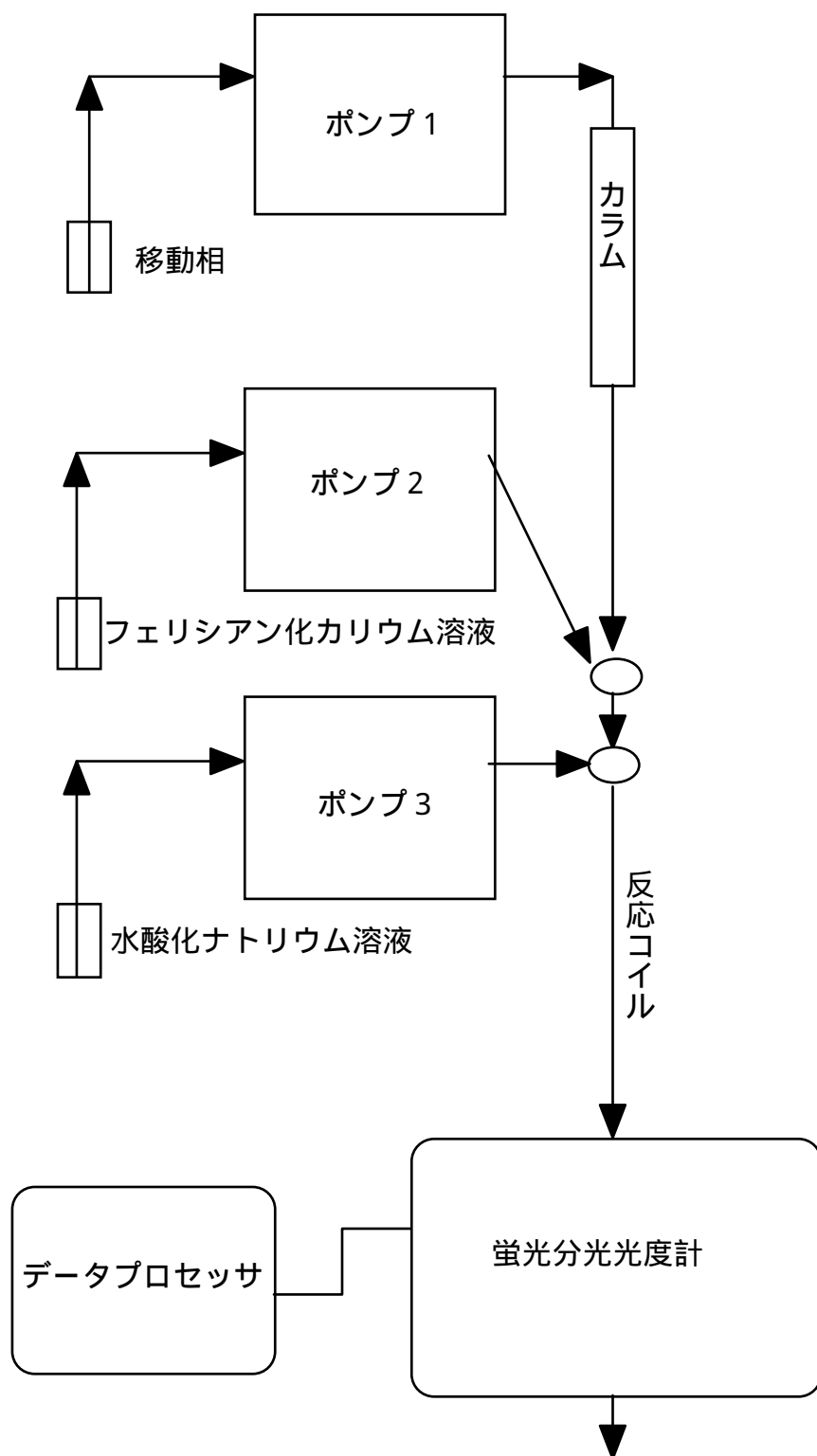


図 3 . ビタミン B₁ 定量用 HPLC の概略図

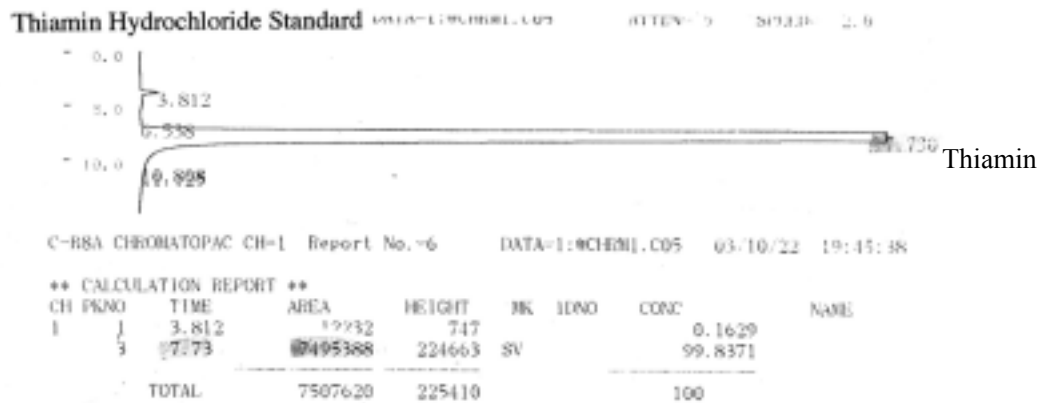


図4．チアミン塩酸塩標準の HPLC クロマトグラムの例

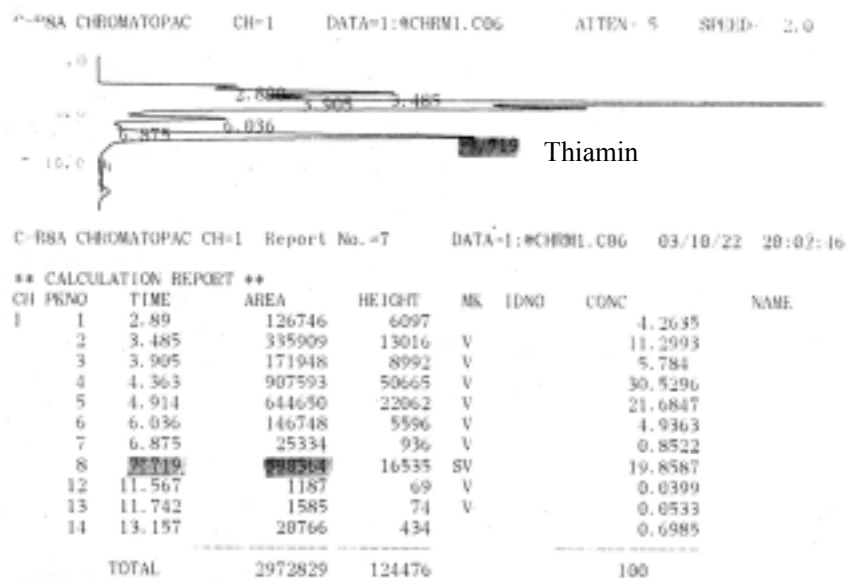


図5．尿（ラット）を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

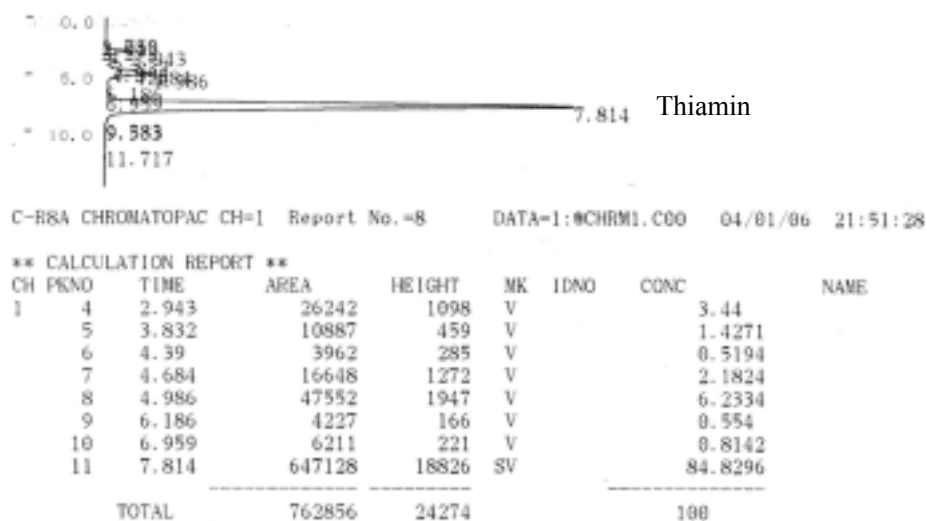


図6．尿（ヒト）を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

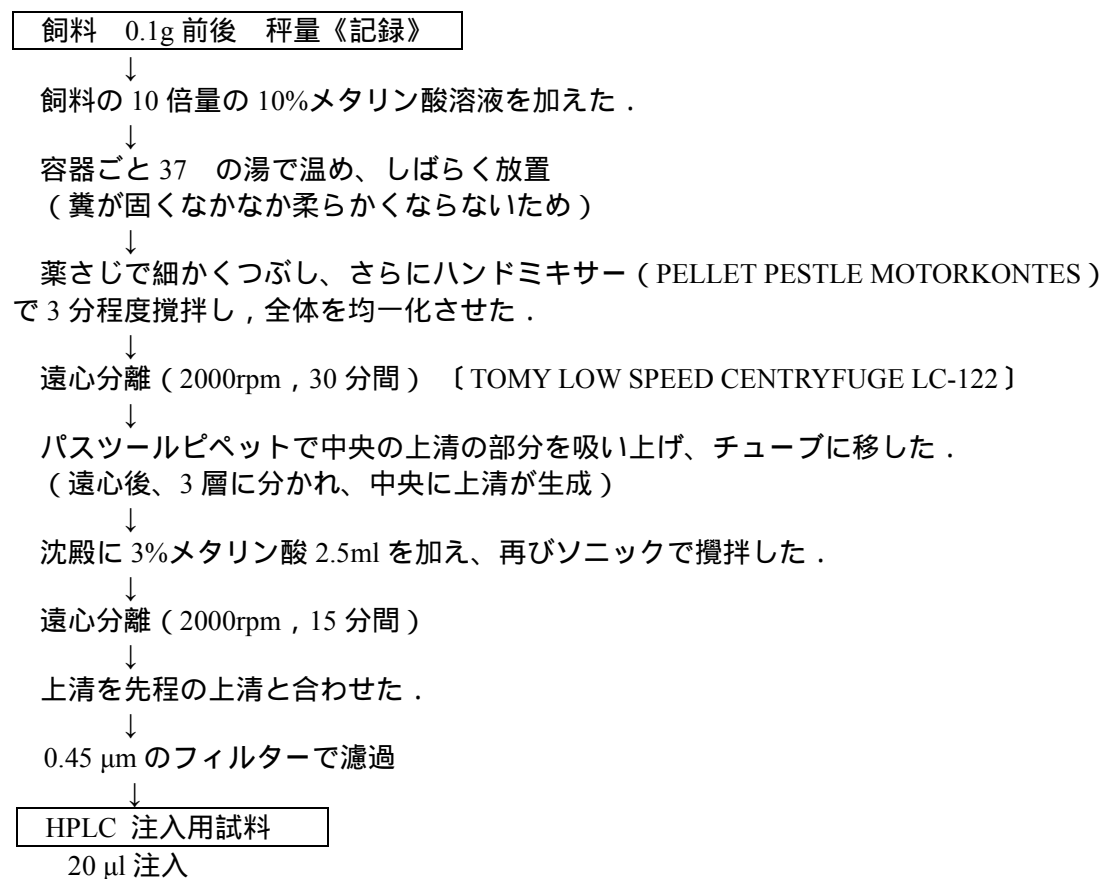


図7．糞中チアミン測定のための HPLC 用試料の調整方法

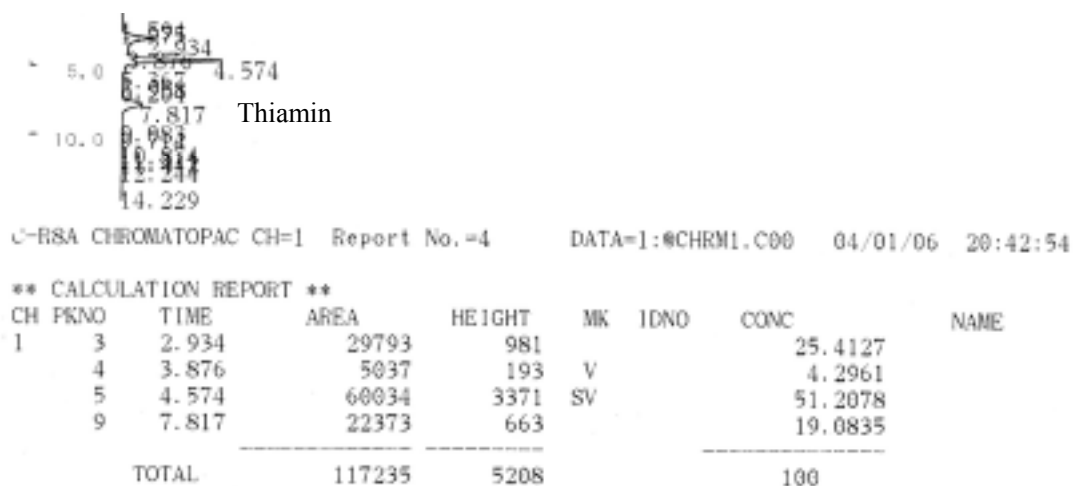


図8 . 糞を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

サンプル前処理

血液 1.5% EDTA 溶液を 25 μ l ねじ口チューブに採取し,エバポレーターであらかじめ乾固させておいた.そこへ血液 200 μ l を採取し,タッチミキサーで混合して,さらに 5% TCA を 400 μ l 加えよく混合した.(氷中保存)
10000 rpm で 5 分間遠心分離し,上清をエッペンに移した.

肝臓 肝臓を 0.5 g 程度切り取り,10 倍量の 5% TCA (約 5ml) 加えてホモゲナイズした.
10000 rpm で 10 分間遠心分離し,上清をエッペンに移した.
遠心分離:微量高速冷却遠心機 MX-300 TOMY 使用

使用するまで-80 で保存した.

サンプル作成

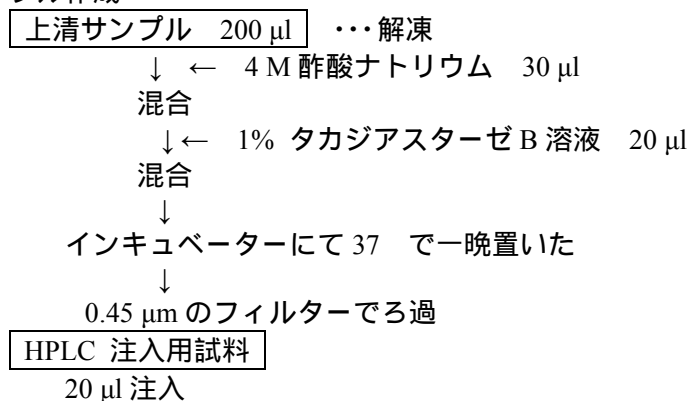


図9 . 血液中・肝臓中チアミン測定のための HPLC 用試料の調整方法

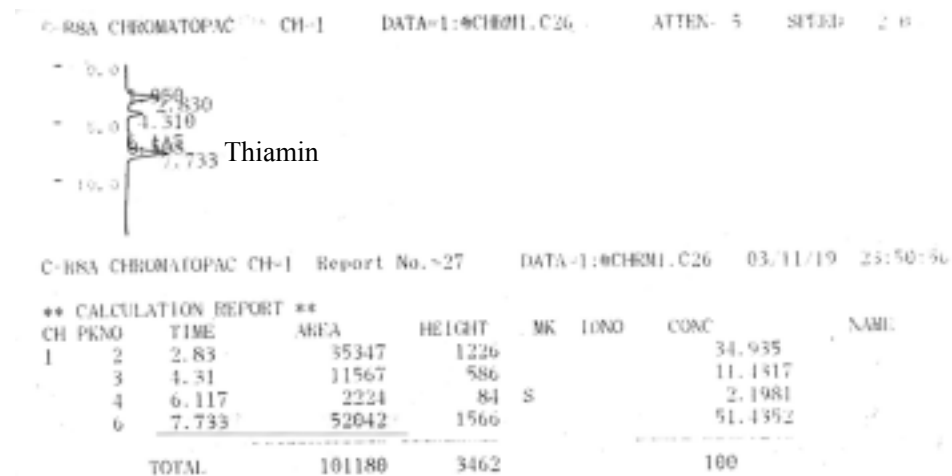


図 10 . 血液を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

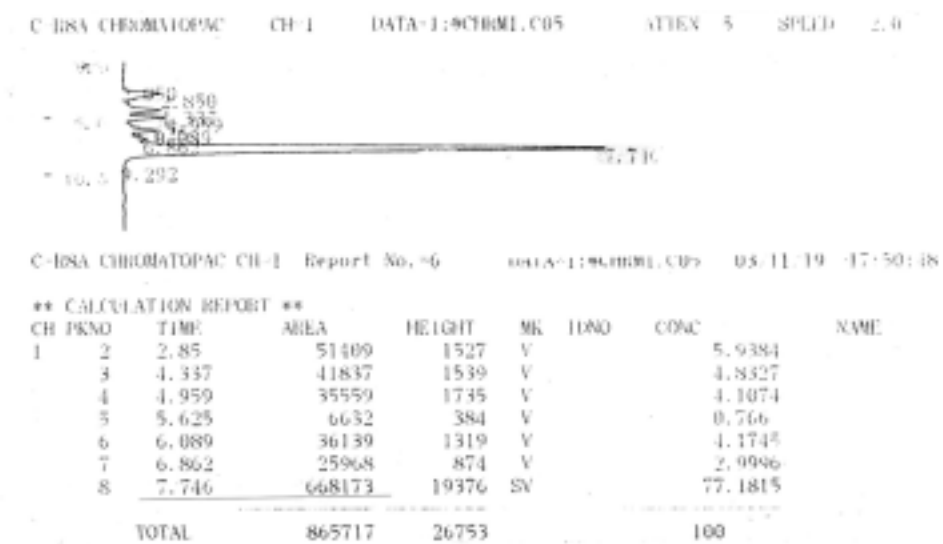


図 11 . 肝臓を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

前処理

- 1) 冷凍保存していた食事 1 食分（昼，夜はご飯を除く）を室温で自然解凍させ，フードプロセッサーに液体も全て一緒に入れ，均一になるまで粉碎した．
- 2) ご飯に少量の水を加えフードプロセッサーで粉碎した．
- 3) できた食事 1 食分の懸濁物の全量を正確に秤量した．
- 4) これを試料とした．

試料（褐色ねじ口瓶に 3～5 g）秤量《記録》

↓ ← 0.1 M 塩酸 25 ml

沸騰水中，15 分間

↓
冷却

↓
4 M 酢酸ナトリウムを 1 ml 程度加え，pH 4.5 に合わせた．

↓ ← 2.5% タカジアスターゼ B 溶液 5 ml

恒温水槽で 37～40℃，16～17 時間

↓
試料溶液を 50 ml メスフラスコに移し，80 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 [pH 4.5] で 50 ml に定容した．

↓
濾過（漏斗，濾紙を使用）

↓
0.45 μm のフィルターで濾過

↓
HPLC 注入用試料

20 μl 注入

タカジアスターゼ B 中にチアミンが含まれているかどうかを，食品試料を含まない状態で上記と同様の操作を行い、測定した．

図 12．食事中ビタミン B₁ 測定のための HPLC 用試料の調整方法

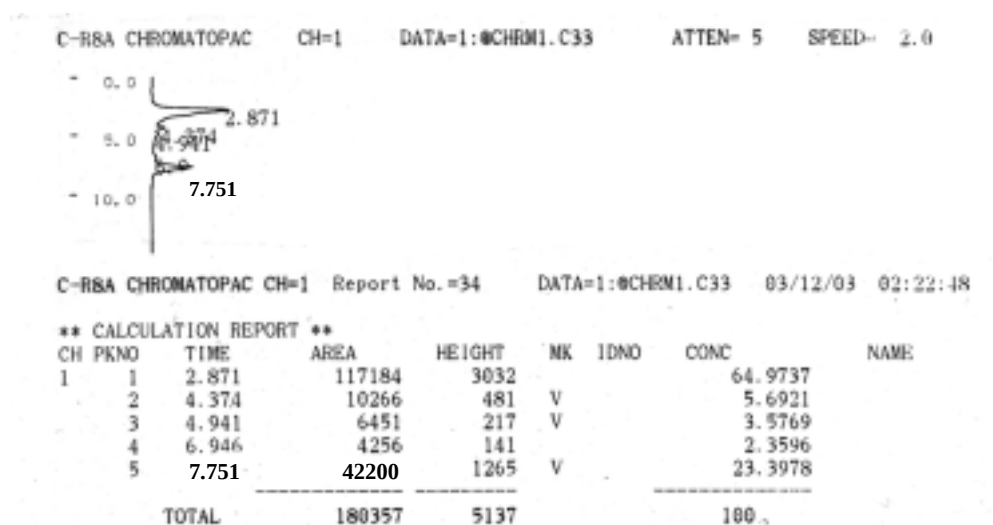


図 13．食事サンプルを試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例