

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

2. ビタミン B₂ 定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したビタミン B₂ 及びその関連化合物の測定方法をまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中リボフラビン測定方法

1-1. 試薬作成方法

riboflavin 標準（褐色瓶，凍結保存）

riboflavin = 376.36

（和光純薬工業株式会社，一級試薬）

- 1) riboflavin を 0.010 g 秤量し，0.1 M KPB (pH 7.0) を 10 ml 加え，懸濁液を均一化した。
- 2) 1) を 100 μ l 取り，0.1M KPB (pH 7.0) 9.90 ml に溶解させた。
- 3) 2) の吸光度を測定し， ϵ 445.0 nm = 12500 より正確な濃度を求めた。（図 1）
- 4) 3) を 100 μ l とり，0.1 M KPB (pH 7.0) を 900 μ l 加え，10 倍希釈して使用した。

0.1 M KPB (pH7.0) (冷蔵保存)

リン酸二水素カリウム：KH₂PO₄ = 136.09

Potassium Dihydrogenphosphate

（和光純薬工業株式会社 特級試薬）

$136.09 \times 0.1 \times 0.5 = 6.805$

リン酸水素二カリウム：K₂HPO₄ = 174.18

Dipotassium Hydrogenphosphate

（和光純薬工業株式会社 特級試薬）

$174.18 \times 0.1 \times 0.5 = 8.709$

- 1) ビーカーに KH₂PO₄ 6.8 g 秤量し，超純水で溶解させ 500 ml に定容した。
- 2) ビーカーに K₂HPO₄ 8.7 g 秤量し，超純水で溶解させ 500 ml に定容した。
- 3) 0.1 M K₂HPO₄ のビーカーに 0.1 M KH₂PO₄ を加えていき，pH 7.0 に合わせた。

1 M NaH₂PO₄ (pH 5.5)（冷蔵保存）

Sodium Dihydrogenphosphate Dihydrate=156.01

（和光純薬工業株式会社，特級試薬）

$156.01 \times 0.2 \times 1 = 31.202$

- 1) NaH₂PO₄ · 2H₂O を 31.2 g 秤量し，170 ml の超純水に溶解させた。
- 2) 6 M NaOH を少しずつ加え，pH 5.5 に合わ

せ，超純水で 200 ml に定容した。

6 M NaOH（冷蔵保存）

Sodium Hydrogenphosphate = 40.00

（和光純薬工業株式会社，特級試薬）

$40.00 \times 0.1 \times 6 = 24.0$

NaOH を 24.0 g 秤量し，ドラフト内で氷冷しながら（熱と臭気を伴うため），80 ml の超純水で溶解させ，100 ml に定容した。

1-2. 試料調製方法

尿を用いた時のビタミン B₂ 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

尿中 RF は，riboflavin が発する蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定した。

移動相： 1M NaH₂PO₄ (pH5.5) 7 ml
Methanol 300 ml
Ultra-pure water 693 ml

流速： 0.8 ml / min

Pressure： 140 kgf / cm²

カラム： Tosoh ODS - 80Ts (φ 4.6 × 250 mm)

カラム温度： 40℃

検出器： RF-10A XL SHIMADZU

検出方法：蛍光法

（励起波長 445nm，蛍光波長 530nm）

Auto injector： stop time 20 min

データプロセッサー： stop time 19 min

riboflavin 検出時間： 14 min

riboflavin 標準 1 pmol 当たりの AREA：20000

1-4. 計算方法

1) 3.8560×10^{-5} M のリボフラビン標準溶液を 10 倍希釈して 20 μ l インジェクションした。（77.12pmol インジェクションした。）

そして，1pmol 当たりの AREA を計算した。（約 20000 / pmol）（図 3）

2) 試料の検出 AREA / 1pmol 当たりの AREA
 $\times 24 \text{ 時間尿の全量(ml)} / 0.02 \text{ (ml)} \times 10^{-3}$
 $= \frac{\text{nmol}}{\text{day}}$
 $\times 0.02 \text{ ml} = \text{試料注入量}$
 例) ラット尿 (図 4)
 $1155410/21344 \times 25/0.02 \times 10^{-3} = 67.7 \text{ nmol / day}$

2. HPLC による糞中総ビタミン B₂ 測定方法

2-1. 試薬作成方法

lumiflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

lumiflavin = 256.3 (SIGMA)

- 1) 100 μg / ml の lumiflavin 標準溶液を作成.
lumiflavin を 0.0010 g 秤量し, 超純水 10 ml に溶解させた.
- 2) 10 μg / ml の lumiflavin 標準溶液を作成.
1) を 100 μl とり, 超純水を 9.9 ml 加えて, 100 倍希釈した.
- 3) 2) の吸光度を測定し, ϵ 444.0 nm = 10900 より正確な濃度を求めた. (図 5)
- 4) 3) を 50 μl とり, 950 μl の 超純水を加えて 20 倍希釈し, 標準とした.

riboflavin 標準 (褐色瓶, 凍結保存)

riboflavin = 376.36

(和光純薬工業株式会社, 一級試薬)

- 1) riboflavin を 0.010 g 秤量し, 0.1 M KPB (pH 7.0) 10 ml 加え, 懸濁液を均一化した.
- 2) 1) を 100 μl 取り, 0.1M KPB (pH 7.0) 9.90 ml に溶解させた.
- 3) 2) の吸光度を測定し, ϵ 445.0 nm = 12500 より正確な濃度を求めた.
- 4) 3) を 200 μl とり, 0.1M KPB (pH 7.0) 200 μl に加え 2 倍希釈し, 使用した.

0.5 M H₂SO₄ (冷蔵保存)

Sulfuric Acid 96.0~98.0% 18 M

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

超純水 972.2 ml に硫酸 27.8 ml を氷で冷やしながら加えた.

10%TCA (室温保存)

Trichloroacetic Acid = 163.39

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

TCA を 20 g 秤量し, 超純水 180 ml で溶解させた.

1 M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydrogenphosphate = 40.00

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$40.00 \times 0.1 \times 1 = 4.0$

NaOH を 4.0 g 秤量し, ドラフト内で氷冷しながら (熱と臭気を発するため), 80 ml の超

純水に溶解させ, 100 ml に定容した.

酢酸

和光純薬工業株式会社, 特級試薬をそのまま使用.

以下, 尿中 Riboflavin 測定と同じ試薬を使用.

2-2. 試料調製方法

糞中総ビタミン B₂ 量は, 沸騰水浴中で RF の温熱抽出を行った後, アルカリ性下で光をあて, RF, FMN, その他の RF 誘導体をルミフラビンに分解し, ルミフラビンの蛍光を蛍光検出器付きの HPLC で測定したものである. (図 6)

2-3. 測定条件

移動相: 1 M NaH₂PO₄ (pH5.5) 6.5 ml
 Methanol 350 ml
 Ultra-pure water 643.5 ml

流速: 0.8 ml / min

Pressure: 136 kgf / cm₂

カラム: Tosoh ODS-80Ts (ϕ 4.6×250mm)

カラム温度: 40℃

検出器: RF-10A XL SHIMADZU

検出方法: 蛍光法

(励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm)

Auto injector: stop time 20 min

データプロセッサー: stop time 19 min

lumiflavin 1 pmol 当たりの AREA: 24000

riboflavin から lumiflavin への転換率:

65%前後

2-4. 計算方法

- 1) 1.3982×10^{-5} M のルミフラビン標準溶液を 20 倍希釈して 50 μl インジェクションした. (34.955pmol インジェクションした.) そして, 1pmol 当たりの AREA を計算した. ...a
 (約 24000 / pmol) (図 7)

- 2) riboflavin から lumiflavin への転換率を計算した. (図 8)

転換率: 試料液全量 1000 μl , そこに含まれる

試料 100 μl . $100 / 1000$

光照射に用いる液量 200 μl

光照射された試料の全量 420 μl ,

HPLC 注入量 50 μl . $50 / 420$

$100 / 1000 \times 200 \times 50 / 420 = 2.38 \mu\text{l}$

正確な濃度を求めた riboflavin 標準 2.38 μl 中に含まれるモル数を求めた. ... b

(既知濃度の riboflavin 検出 AREA) / a

$\times 1 / \frac{b}{c} \times 100 = \frac{c}{b} \%$

例) $150425/24000 \times 1/10.044 \times 100 = 62.4\%$

3) 懸濁液の全量

$10.46 \text{ ml} / \{24 \text{ 時間糞量 (g)}\}$

$= \{24 \text{ 時間糞懸濁液全量 (ml)}\} \dots d$

※ $10.46 \text{ ml} = \text{糞 } 1 \text{ g からできる糞懸濁液の量}$

4) (検出 AREA) / $\frac{a}{c} \times \frac{d}{2.38 \mu\text{l}} \times 100 / 10^{-6} = \dots \mu\text{mol} / \text{day}$

例) ラット糞 (図 9)

$290144/24000 \times 6.18/2.38 \times 100/62.4 \times 10^{-6}$

$= 50.3 \mu\text{mol} / \text{day}$

3. HPLC による血液中, 肝臓中総ビタミン B₂ (Riboflavin, FMN, FAD) 量の測定方法

3-1. 試薬作成方法

“糞中総ビタミン B₂ 量測定方法”と同様。

3-2. 試料調製方法

血液中, 肝臓中のビタミン B₂ は, RF, FMN, FAD の三型で存在している。その三型を温熱抽出し, アルカリ性下で光をあて, ルミフラビンに分解し, ルミフラビンの蛍光を蛍光検出器付き HPLC で総ビタミン B₂ 量として測定したものである。(図 10, 11)

3-3. 測定条件

“糞中ビタミン B₂ 量測定方法”と同様。

3-4. 計算方法

血液

1) lumiflavin 標準 1 pmol 当たりの AREA を計算した。... a

2) riboflavin から lumiflavin への転換率を計算した。

転換率: 試料液全量 1000 μl , そこに含まれる試料 100 μl . $100 / 1000$

光照射に用いる液量 200 μl

光照射された試料の全量 420 μl ,

HPLC 注入量 100 μl . $100 / 420$

$100 / 1000 \times 200 \times 100 / 420 = 4.76 \mu\text{l}$

正確な濃度を求めた riboflavin 標準 4.76 μl 中に含まれるモル数を求めた。... b

(既知濃度の riboflavin 検出 AREA) / $\frac{a}{c} \times 1 / \frac{b}{c} \times 100 = \dots \%$

3) (検出 AREA) / $\frac{a}{c} \times 1000 \mu\text{l} / 9.52 \mu\text{l} \times 100 / \frac{c}{2} \times 2 = \dots \text{pmol} / \text{ml}$

※ $2 = 2 \text{ 倍希釈された全血の真の量}$

$9.52 \mu\text{l} = \text{注入量 } 100 \mu\text{l} \text{ 中に含まれる試料の量}$

例) ラット血液 (図 12)

$32975/24000 \times 1000/9.52 \times 100 / 75.2 \times 2$

$= 383.8 \mu\text{mol} / \text{day}$

肝臓

1) lumiflavin 標準 1 pmol 当たりの AREA を計算した。... a

2) riboflavin から lumiflavin への転換率を計算した。

転換率: 試料液全量 1000 μl , そこに含まれる試料 100 μl . $100 / 1000$

光照射に用いる液量 200 μl

光照射された試料の全量 420 μl ,

HPLC 注入量 50 μl . $50 / 420$

$100 / 1000 \times 200 \times 50 / 420 = 2.38 \mu\text{l}$

正確な濃度を求めた riboflavin 標準 2.38 μl 中に含まれるモル数を求めた。... b

(既知濃度の riboflavin 検出 AREA) / $\frac{a}{c} \times 1 / \frac{b}{c} \times 100 = \dots \%$

3) 肝臓中総ビタミン B₂ 量

検出 AREA / $\frac{a}{c} \times 1000 \mu\text{l} / 2.38 \mu\text{l} \times 100 / \frac{c}{10.3} \times 10.3 \text{ ml} \times 10^{-3} = \dots \text{nmol} / \text{g of liver}$

※ $10.3 \text{ ml} = \text{肝臓 } 1 \text{ g でできるホモジネート量}$

例) ラット肝臓 (図 13)

$309863/24000 \times 1000/2.38 \times 100/60.1 \times 10.3 \times 10^{-3}$

$= 93.0 \text{ nmol} / \text{g of liver}$

4. HPLC による食品中のビタミン B₂ 量の測定方法

4-1. 試薬作成方法

4 M 酢酸ナトリウム (冷蔵保存)

Sodium Acetate Trihydrate = 136.08

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

$136.08 \times 4 \times 0.1 = 54.432$

酢酸ナトリウム・三水和物を 54.4 g 秤量し, 超純水 80ml に溶解させ, 超純水で 100 ml に定容した。

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 を取り, 800 ml の超純水に加え, 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。

0.1 M HCl (冷蔵保存)

Hydrochloric Acid 35~37 %

(和光純薬工業株式会社, 特級試薬)

HCl (11.6 M) を 8.6 ml 取り, 超純水 991.4

ml を加え、混和した。

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。

4-2. 試料調製方法

食品を用いた時のビタミン B₂ 定量用 HPLC 注入試料作成の操作方法を図 13 に示した。

4-3. 測定条件

移動相: 酢酸緩衝液(pH4.5) 650 ml

Methanol 350 ml

流速: 0.8 ml/min

Pressure: 145 kgf/cm²

カラム: Tosoh ODS-80Ts (φ4.6×250mm)

カラム温度: 40°C

検出器: RF-10A XL SHIMADZU

検出方法: 蛍光法

(励起波長 445 nm, 蛍光波長 530 nm)

Auto injector: stop time 15 min

データプロセッサー: stop time 14 min

4-4. 計算方法

1) Riboflavin の標準より, 1pmol 当たりの AREA を計算した。

2) {(試料の AREA)-(タカジアスターゼ B の AREA)} / (標準 1pmol あたりの AREA)×50 ml / 0.05 ml × (試料の全量) / (秤量した試料の重さ) × 10⁻⁶ = a μmol / 食事一食分
 a × 376.36 × 10⁻³ = mg / 食事一食分
※ 50 ml = 全量, 0.05 ml = 注入量,
376.36 = Riboflavin の分子量

例) 食事サンプル (図 15, 16)

(232485-45768) / 20000 × 50 / 0.05 × 428.34

/ 3.1306 × 10⁻⁶ = 1.2774 μmol / 食事一食分

1.2774 × 376.36 × 10⁻³ = 0.4808 mg / 食事一食分

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

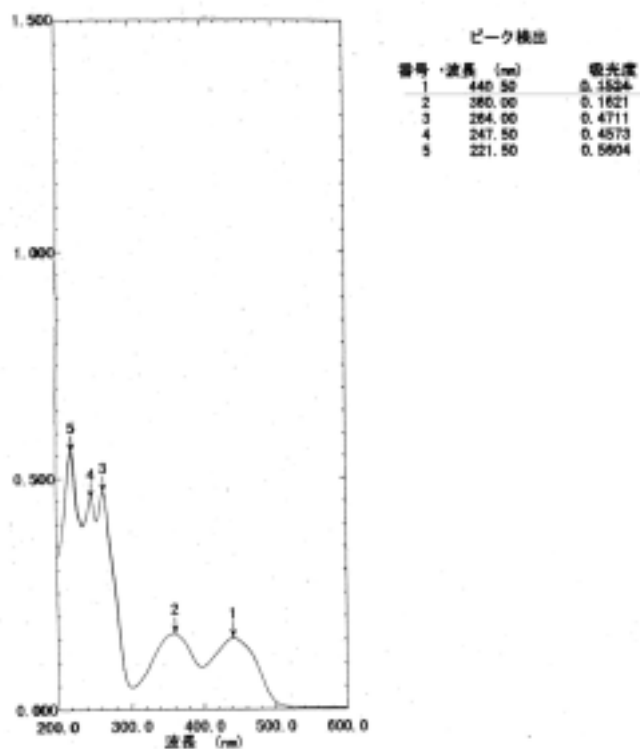


図1. リボフラビンの UV スペクトラム

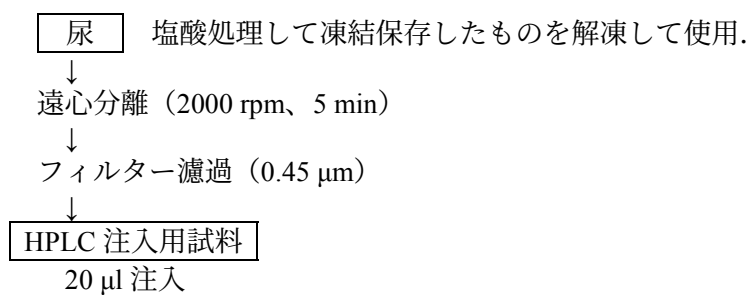


図2. 尿中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法

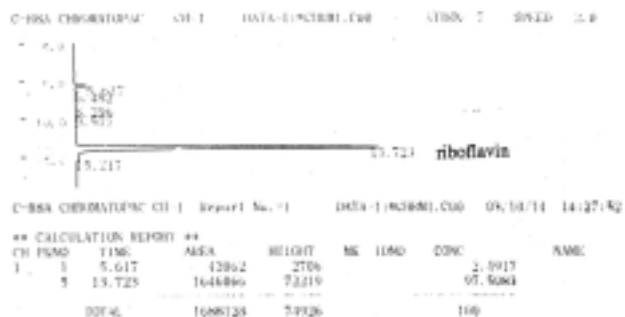


図3. 標準のリボフラビンの HPLC クロマトグラムの例

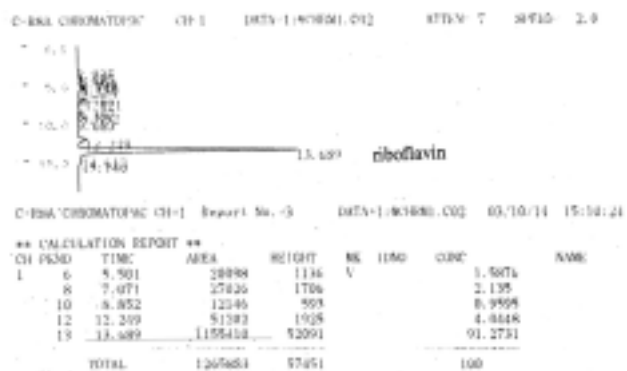


図4. 尿を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

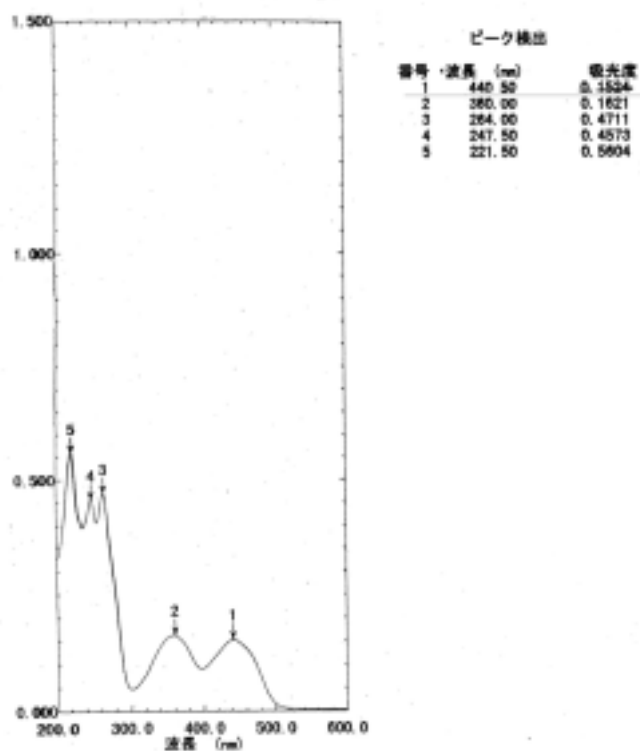
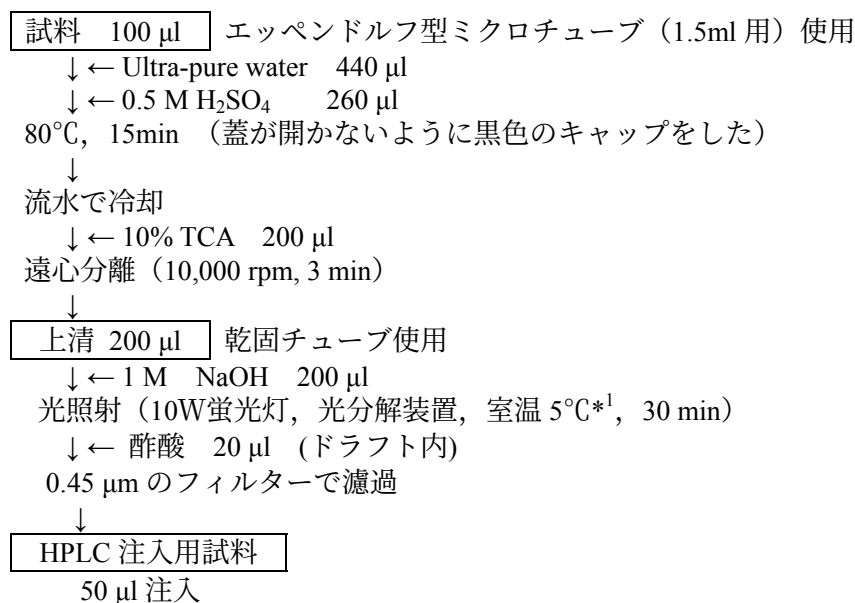


図5. ルミフラビンの UV スペクトラム

- 1) 1 日糞の重量を下三桁 (0.000g) まで正確に測定し、アルミ箔で覆ったねじ口試験管に入れ、その重量の 10 倍量の 0.1 M KPB (pH7.0)を加え、ソニケーター(output control 65. 粉々になるまで、30 秒ソニックして、30 秒氷冷の繰り返し)で粉碎した。
- 2) 1) を 0.5 ml とり、アルミ箔で覆った試験管に入れ、0.1 M KPB(pH7.0)を 9.5ml 加え、20 倍希釈した。
- 3) 3 分おきに振り混ぜながら恒温水層につけ、温熱抽出を行った。(80°C, 15 分間)
- 4) 3) を水で冷やし、これを試料とした。



※ 光照射をすることで、試料中の riboflavin, FMN, FAD を lumiflavin に分解し、総ビタミン B₂ とするものであるが、riboflavin, FMN, FAD は 100% lumiflavin に転換されるわけではない。そこで転換率を求めるために、既知濃度の riboflavin 標準液を試料として、上記の操作を同時に行った。

※ riboflavin は光に弱いので、実験操作は全てできる限り遮光しながら行った。

*1 蛍光灯の熱によって試料液が蒸発することを防ぐため、低温室 (温度設定 5°C) で光照射を行った。

光分解装置

乾固チューブ底の液面から 20 cm 離れた高さから、蛍光灯の光が当たるように木の箱 (縦 35 cm×横 25 cm×高さ 28 cm) を作り、内面をすべてアルミ製のシールで覆い、内部で蛍光灯の光が反射するようにした。

図 6. 糞中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法

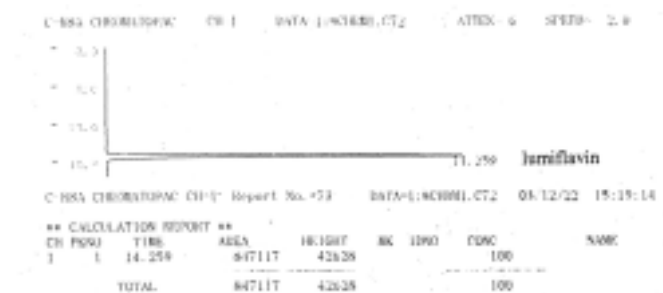


図7. 標準のルミフラビンのHPLCクロマトグラムの例

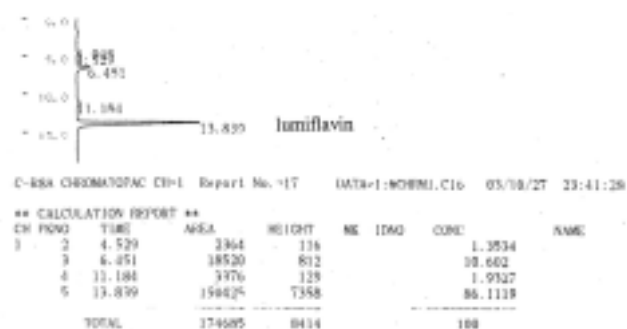


図8. 標準リボフラビンからルミフラビンへの転換率計算のためのHPLCクロマトグラムの例



図9. 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) 血液 500 μl 採血後, 直ちに氷冷水 500 μl を加え, タッチミキサーで攪拌後, 5 分以上氷冷した. (凍結保存)
- 2) 使用時に 1) を解凍し, タッチミキサーでさらさらになるまで攪拌し, 均一化した.

【サンプル作成】

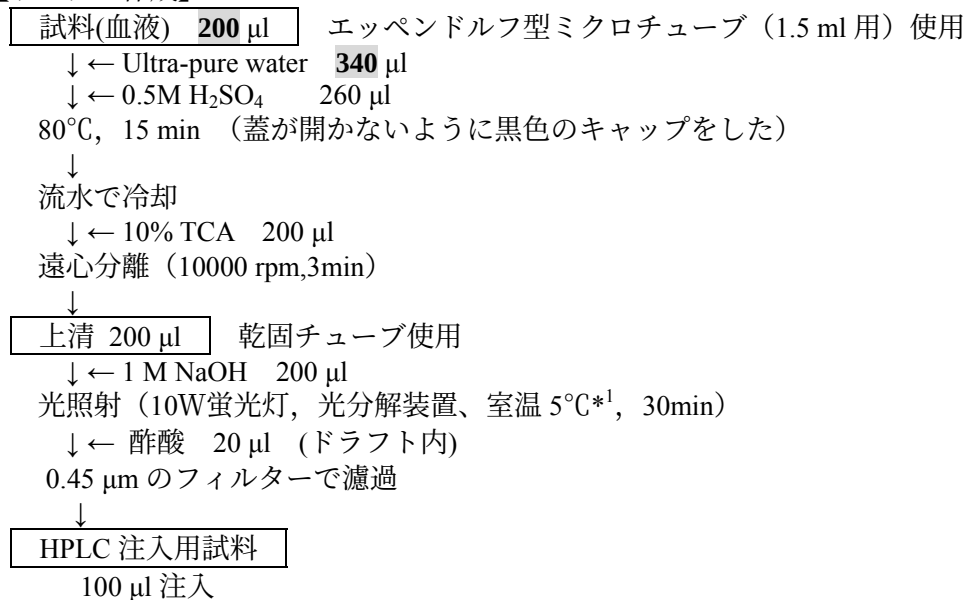


図 10. 血液中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法

【サンプル前処理】

肝臓 凍結肝臓 0.5 g 以下を正確に測り取り，その 10 倍量の 50 mM KPB (pH 7.0) を加えてホモゲナイズ（テフロンホモゲナイザー, 1500 rpm, 2 min）した。

【サンプル作成】

ホモジネート 100 μ l エッペンドルフ型マイクロチューブ(1.5 ml 用)使用
 ↓ ← Ultra-pure water 440 μ l
 ↓ ← 0.5 M H₂SO₄ 260 μ l
 80°C, 15 min （蓋が開かないように黒色のキャップをした）
 ↓
 流水で冷却
 ↓ ← 10 % TCA 200 μ l
 遠心分離（10,000rpm, 3 min）
 ↓
 上 清 200 μ l 乾固チューブ使用
 ↓ ← 1M NaOH 200 μ l
 光照射（10 W 蛍光灯，光分解装置、室温 5 °C*¹，30 min）
 ↓ ← 酢酸 20 μ l （ドラフト内）
 0.45 μ m のフィルターで濾過した
 ↓
 HPLC 注入用試料
 50 μ l 注入

※光照射をすることで，試料中の riboflavin, FMN, FAD を lumiflavin に分解し，総ビタミン B₂ とするものであるが，riboflavin, FMN, FAD は 100% lumiflavin に転換されるわけではない．そこで転換率を求めるために，既知濃度の riboflavin 標準液 100 μ l を試料として，上記の操作を同時に行った．その際全量を合わせるために，加える Ultra-pure water を 440 μ l とした．

※ riboflavin は光に弱いため、実験操作は全てできる限り遮光しながら行った．

*1 蛍光灯の熱によって試料液が蒸発することを防ぐため，低温室（温度設定 5°C）で光照射を行った．

図 11. 肝臓中リボフラビン測定のための HPLC 用試料の調整方法



図 12. 血液を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの例

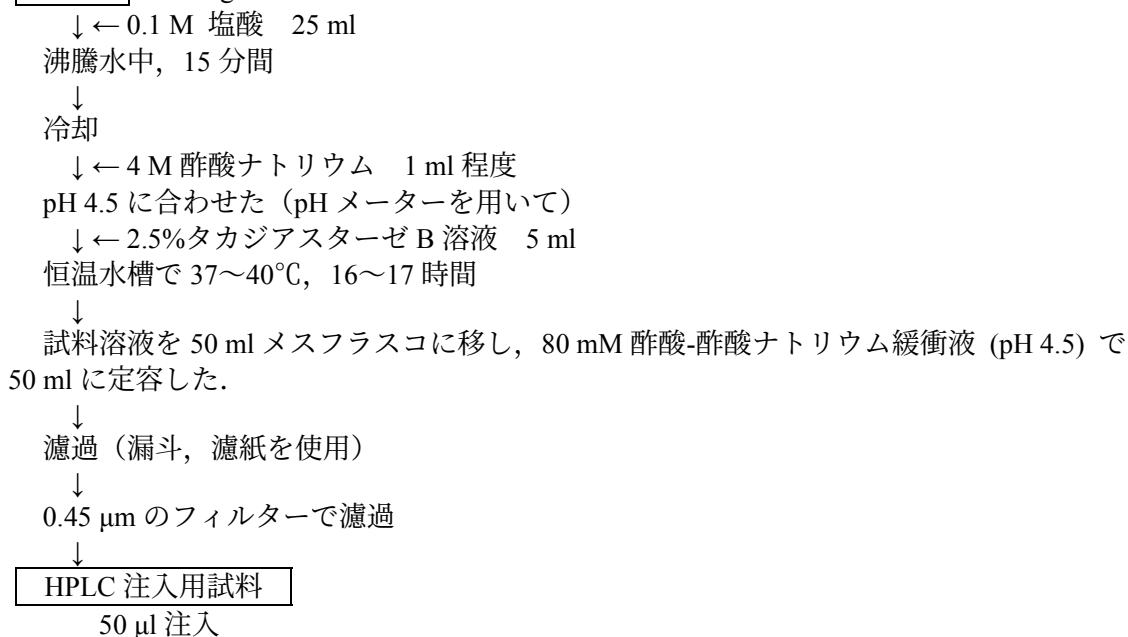


図 13. 肝臓を試料としたときの HPLC のクロマトグラムの場合

前処理

- 1) 凍結保存していた食事 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（National MK-K77-W スピードカッター）に液体も全て一緒に入れ，均一になるまで粉碎した（約 2 分間）.
- 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 食分の懸濁液の全量を正確に秤量した.
- 4) これを試料とした.

試料 （3～5 g を 60 ml 容量褐色ねじ口瓶に）



※タカジアスターゼ B の中にも若干のリボフラビンが含まれているため，以下の操作を平行して行った.

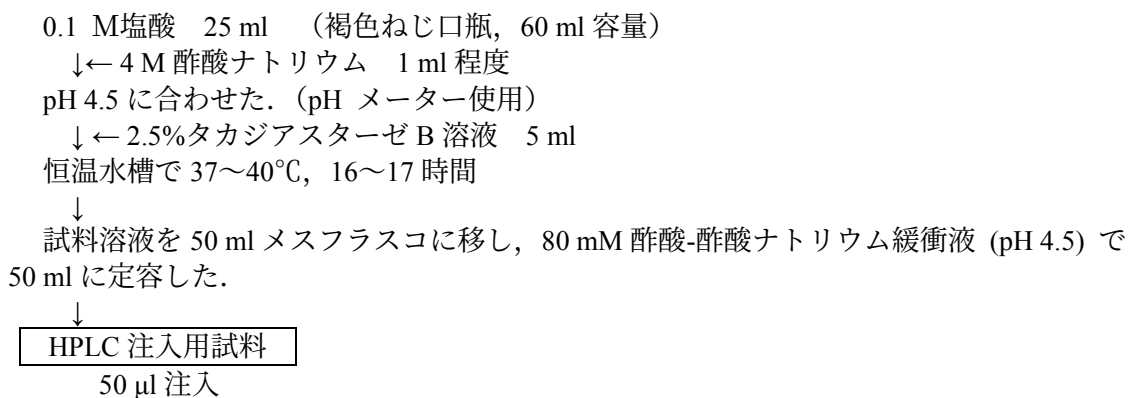


図 14. 食品中ビタミン B₂ 測定のための HPLC 用試料の調整方法

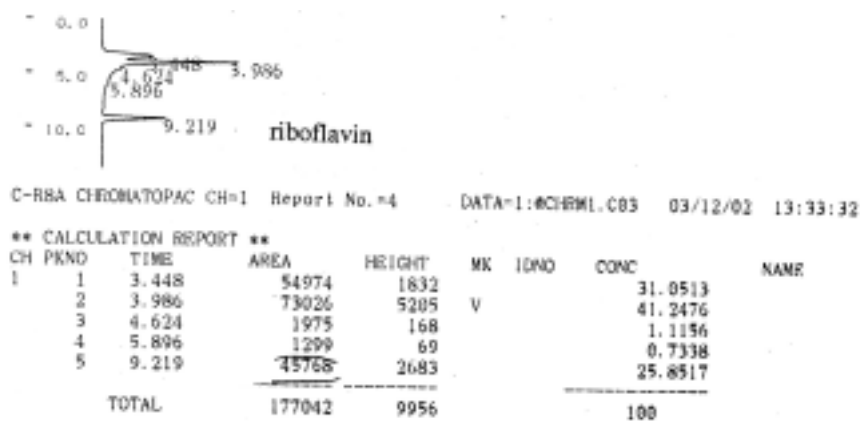


図 15. タカジアスターゼ B 中のリボフラビン測定のための HPLC クロマトグラムの例

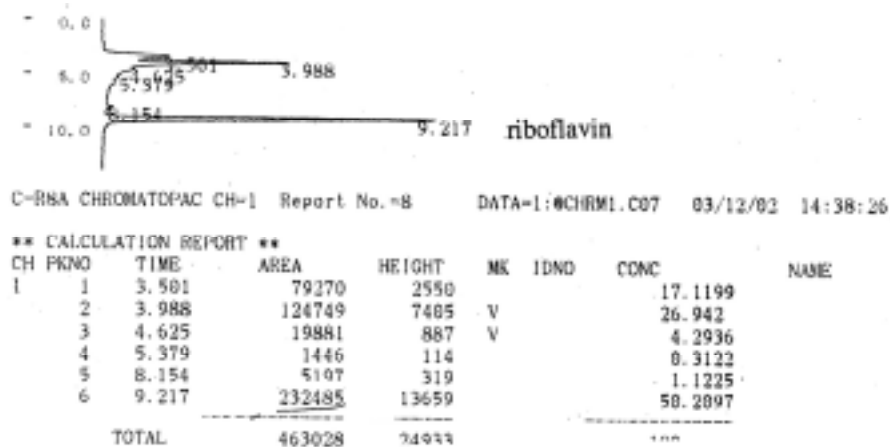


図 16. 食事サンプルを試料としたときの HPLC クロマトグラムの例