

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

4. ビタミンB₁₂の定量方法

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B₁₂の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1 微生物定量法による尿中のビタミンB₁₂測定方法

1-1. 試薬作成方法

V.B₁₂標準液 (0.1ng/ml)

Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) = 1355.38 (和光純薬工業株式会社, 冷蔵保存)

1) 1mg/mlのV.B₁₂を作成. V.B₁₂を0.001g秤量し1mlの25%EtOHを加えて溶かした.

2) 50μl/mlのV.B₁₂を作成. 1)を50μl取り, 25%EtOH 950μlを加えて, 20倍希釈した.

3) 10μl/mlのV.B₁₂を作成. 2)を600μl取り, 25%EtOH 2400μlを加えて, 5倍希釈した. この溶液の吸光度を測定し, 正確な濃度を求める. UVスペクトルを図1に示した.

4) 1μg/mlのV.B₁₂を作成. 3)を500μl取り, 25%EtOH 4500μlを加えて, 10倍希釈した. 冷蔵保存, 以下用事希釈.

5) 50ng/mlのV.B₁₂を作成. 3)を50μl取り, 超純水 950μlを加えて, 20倍希釈した.

6) 1ng/mlのV.B₁₂を作成. 4)を20μl取り, 超純水 980μlを加えて, 50倍希釈した.

7) 0.1ng/mlのV.B₁₂を作成. 5)を0.5ml取り, 超純水 4.5mlを加えて, 10倍希釈し, 標準とした.

25%EtOH

Ethanol = 46.07

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

EtOH 25mlに超純水75mlを加え, 100mlにした.

0.1 M KPB (pH6.2)

1) 0.1M KH₂PO₄

KH₂PO₄ = 136.09

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$0.1M \times 136.09 \times 500 / 1000 = 6.8045$ (g)

KH₂PO₄を6.8045 g秤量し, 超純水で500mlにした.

2) 0.1M K₂HPO₄

K₂HPO₄ = 174.18

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

$0.1M \times 174.18 \times 500 / 1000 = 8.709$ (g)

K₂HPO₄を8.709 g秤量し, 超純水で500mlにした.

3) 1)に2)を加え, pH6.2に調製した.(5:1の割合)

0.9% 滅菌生理食塩水

NaCl = 98.08

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

1) NaClを4.5g秤量し超純水で500mlにメスアップする.

2) 試験管(12×120mm)に5mlずつ分注し, キャップをする.

3) オートクレーブ(121, 5min)し冷却後, 冷蔵保存.

10% (w/v) メタリン酸溶液

Metaphosphoric Acid.Lump Assay (as HPO₃) = min 37.0%

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

メタリン酸 8.108 g秤量し, 超純水にて 30mlにメスアップした.

0.025% KCN (劇薬なので管理に注意)

Potassium Cyanide = 65.12

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

KCN 0.0025 gを秤量し, 10mlの超純水に溶かした.

0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.8) (冷蔵保存)

1) 0.1 M 酢酸ナトリウム

Sodium Acetate Trihydrate = 136.08

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

酢酸ナトリウム 0.6804 gを秤量し, 超純水にて 50ml にメスアップした。

2) 0.1 M 酢酸

Acetic Acid = 60.05

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

酢酸0.5mlに超純水86.5mlを加えた。

3) 1) に 2)を加え, pH 4.8 に調製した。(3:2 の割合)

ライヒマニ保存用培地

日水製薬(株)製のライヒマニ保存用基礎培地を使用した。組成を表1に示した。

寒天 (Agar, Powder)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

1) ライヒマニ保存用培地を10.93gと, 寒天1.5gを秤量し220mlの超純水を加え, 20分くらい煮沸溶解した。

2) ねじ口試験管に4mlずつ分注し, オートクレーブ (121℃, 5min) につけ滅菌した。

3) 5分くらい氷冷し, 1/3 量は高層, 2/3 量は斜面になるように固めた。

4) 冷蔵庫に保存した。

ライヒマニ接種用培地

日水製薬(株)製のライヒマニ接種用基礎培地を使用した。組成を表1に示した。

1) ライヒマニ接種用培地を9.54g秤量し275mlの超純水を加え, 煮沸溶解後10分くらい氷冷した。

2) 試験管に5mlずつ分注し, オートクレーブ (121℃, 5min)につけ滅菌した。

3) 15分くらい氷冷し, 冷蔵庫に保存した。

V.B₁₂定量用培地

日水製薬(株)製のV.B₁₂定量用基礎培地を使用した。組成を表2に示した。

1) V.B₁₂定量用基礎培地を8.3g秤量し80mlの超純水を加え, 煮沸溶解した。

2) 10分ほど氷冷後, pH6.2±0.1に硫酸にて補正し, 添付のポリソルベート80溶液2.0mlを加えてから全容を100mlにした。これが定量用 2 倍濃度基礎培地となる。

1-2. 試料作成方法

図2に試料の作成方法を示した。

1-3. 定量操作方法

接種用菌液作成方法

1) *Lactobacillus leichmanii* ATCC7830(住商ファーマインターナショナル株式会社)の植えてある保存用培地から菌体を一白金耳取り, 斜面培地に塗布し, 37℃で20時間培養した。

2) 20時間培養した斜面培地から菌体を一白金耳取り, 新しい斜面培地に塗布し, 37℃で20時間培養した。

3) 作成した液体培地に, 斜面培地から菌体を一白金耳取り, 37℃で20時間培養した。

4) これを3000rpmで5分間遠心分離を行い, 沈殿部分の菌体を得る。この菌体を滅菌した5mlの0.9%生理食塩水に懸濁し再び遠心分離し, 菌体を洗浄した。この洗浄操作を5回行った。

5. 最終的に集めた菌体を5mlの滅菌した0.9%生理食塩水に懸濁させた。さらに, その懸濁液を滅菌した0.9%生理食塩水にて透過率85%に調節した。これを接種用菌液とし, ピペットマンで20μlずつ定量用試験管に分注した。

1 長期間測定を行わない場合は液体培地中で培養した*Lactobacillus leichmanii*

ATCC7830を「保存用平面寒天培地」に穿刺して接種し, 37℃で20時間培養し, 冷蔵庫で保存した(約一ヶ月保存可能)。

2 保存培地から起こすのは時間がかかるので接種用培地に培養させた菌液を 200 μl滅菌エッペン (1.5ml) に入れ-20℃で凍結保存した。使用時は解凍後, 接種培地に全量入れ, 少なくとも植え継ぎを2回(2日)してから接種菌液として使用した。

定量操作

1) 表3の通り溶液をp.p.tube

(POLYPROPYLEN tube 12×75 mm) に分注した。

2) 検量線用, サンプル用とも3連で行った。

3) 標準 0濃度のうち1本は盲検として菌液を接種しなかった。

4) 分注したp.p.tubeにディスポp.p.キャップをし, オートクレーブ(121℃, 3min, プラス1気

- 圧)にかけ滅菌した。
- 5) オートクレーブ後、直ちに氷令した。
- 6) 冷めたら、透過率85%に調整(混濁菌液,約500μlを5ml滅菌生理食塩水に加えた。)した菌液を20μlずつ分注した。
- 7) 37 の孵卵器で16~20時間培養した。
- 8) 波長 660nmの比濁計で、盲検のtubeで 0合わせをした。
- 9) 懸濁液を均一化してから吸光度を測定した。検量線を引き、計算した。
- 検量線の一例を図3に示した。

1-4. 計算方法

- 1) 検量線よりtube当たりのV.B₁₂量 (pg/tube) をもとめた..b
- 2) 尿中V.B₁₂量 (ng/day) = $b / 0.4 \text{ (ml)} \times 1.8 \text{ (ml)} / 0.9 \text{ (ml)} \times 1 \text{ 日尿量 (ml)} / 1000$
 $0.4 \text{ (ml)} = \text{分注した試料量}, 1.8 \text{ (ml)} = \text{試料全量}, 0.9 \text{ (ml)} = \text{使用した尿量}$
 (例) ヒト尿 (通常食)

$$[(0.211 - 0.0634) / 0.005] / 0.4 \times 1.8 / 0.9 \times 794 / 1000 = 117 \text{ ng/day}$$

 $0.211 = \text{吸光度}, y = 0.005x + 0.0634, 794 = \text{全尿量}$

2. 微生物定量法による食品中のビタミンB₁₂測定方法

2-1. 試薬作成方法

0.05% KCN (劇薬なので管理に注意)

Potassium Cyanide = 65.12

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

KCN 0.01 gを秤量し, 20mlの超純水に溶かした。

0.57 M酢酸緩衝液 (pH 4.5) (冷蔵保存)

1) 0.57M 酢酸ナトリウム

Sodium Acetate = 82.03 (和光純薬工業株式会社, 常温保存)

酢酸ナトリウム 14.03 g秤量し, 超純水にて300ml にメスアップした。

2) 0.57 M 酢酸

Acetic Acid = 60.05 (和光純薬工業株式会社, 常温保存)

酢酸 7mlに超純水 206.5ml を加えた。(30.5倍希釈)

3) 1) に 2) を加え, pH 4.8 に調製した。

V.B₁₂標準液, 25%EtOH, 0.1 M KPB (pH6.2),

0.9% 生理食塩水, 10% (w/v) メタリン酸溶液, 0.025% KCN, 0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.8), 保存培地, 斜面培地, 液体培地は1-1.試薬作成方法と同様。

2-2. 試料作成方法

図4に食品の処理方法を示した。

2-3. 定量操作方法

1 接種用菌液作成方法

1-3. 接種用菌液作成方法と同様。

2 定量操作

1-3. 定量操作と同様。

2-4. 計算方法

1) V.B₁₂量

1- 検量線よりtube当たりのV.B₁₂量 (pg/tube) をもとめた..b'

2- $V.B_{12} \text{ 量} (\mu\text{g} / \text{diet}) = b' \times N \times 10 \text{ (ml)} / 0.5 \text{ (g)} \times a / 1000000$

$N = \text{試料調整時の希釈倍数}, 10 \text{ (ml)} = \text{定容量},$

$0.5 \text{ (g)} = \text{処理した食品ホモジネイト量},$

$a = \text{食品ホモジネイト全量}$

2) アルカリ耐性因子含量

1- 検量線よりtube当たりのアルカリ耐性因子含量 (pg / tube) をもとめた..b''

2- $\text{アルカリ耐性因子含量} (\mu\text{g} / \text{diet}) = b'' \times N' \times 10 \text{ (ml)} \times 1.7 \text{ (ml)} / 1.5 \text{ (ml)} / 0.5 \text{ (g)} \times a / 1000000$

$N = \text{試料調整時の希釈倍数}, 10 \text{ (ml)} = \text{定容量},$

$1.7 \text{ (ml)} = \text{アルカリ耐性処理した全量},$

$1.5 \text{ (ml)} = \text{使用したろ液量}$

$0.5 \text{ (g)} = \text{処理した食品ホモジネイト量},$

$a = \text{食品ホモジネイト全量}$

3) V.B₁₂含量 (μg / diet) = V.B₁₂量 (μg / diet) - アルカリ耐性因子含量 (μg / diet)

B. 健康危険情報

特記する情報はない。

C. 研究発表

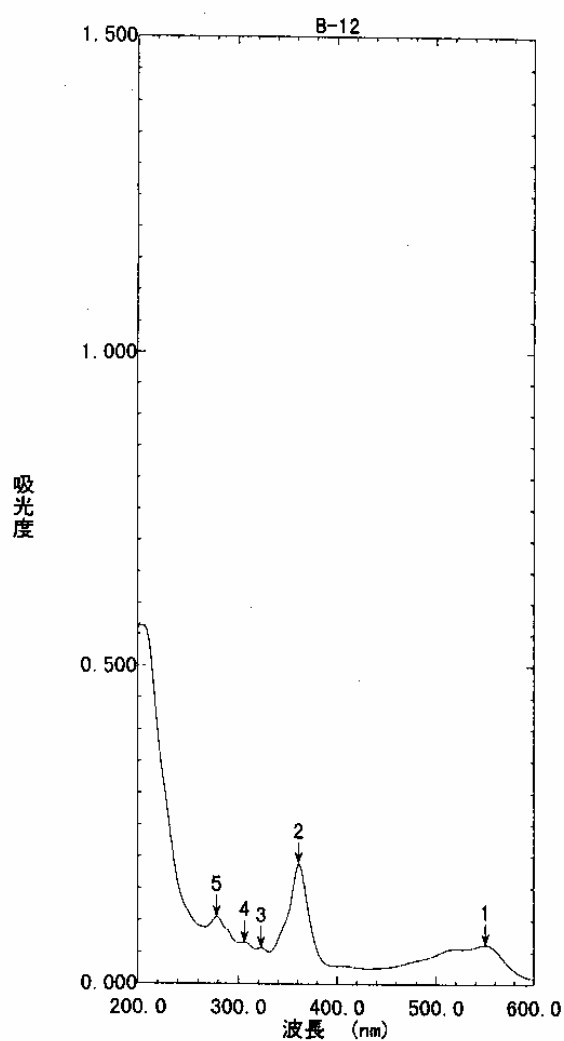
1. 論文発表
なし

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



ピーク検出

番号	波長 (nm)	吸光度
1	550.00	0.0611
2	360.50	0.1879
3	322.50	0.0561
4	308.00	0.0647
5	278.00	0.1043

B12 OD (551nm) = 8.74×10^3
 (361nm) = 28.06×10^3
 (278nm) = 15.5×10^3 より

$0.1879 / 28.06 \times 10^3 = 6.696 \times 10^{-6} \text{ M}$

$0.1046 / 15.5 \times 10^3 = 6.729 \times 10^{-6} \text{ M}$

AVE $6.729 \times 10^{-6} \text{ M}$

B12 (m.v. = 1355.4) より

$6.729 \times 10^{-6} \times 1355.4$

$= 9098.1225 \times 10^{-6} \text{ g/l}$

$= 9.1 \mu\text{g/ml}$...① ※10 $\mu\text{g/ml}$ と考える

① $500 \mu\text{l} + 25\% \text{ EtOH } 4500 \mu\text{l} = 1 \mu\text{g/ml}$...②

② $50 \mu\text{l} + \text{超純水 } 950 \mu\text{l} = 50 \text{ ng/ml}$...③

③ $20 \mu\text{l} + \text{超純水 } 980 \mu\text{l} = 1 \text{ ng/ml}$...④

④ $500 \mu\text{l} + \text{超純水 } 4500 \mu\text{l} = 0.1 \text{ ng/ml}$ 標準

※実際は 0.091 ng/ml

ファイル名 : B-12

作成 : 16:38 03/08/07
 データ : オリジナル

測光値 : 吸光度
 スキャン速度 : 高速
 スリット幅 : 2.0
 サンプルングピッチ : 0.5

図1 . シアノコバラミン標準溶液の吸収スペクトルの一例

尿処理方法

尿	0.9ml
0.1M酢酸緩衝液(pH 4.8)	0.18ml
超純水	0.68ml
0.025% KCN	0.02ml

サンプルストックチューブ(2ml : BM)

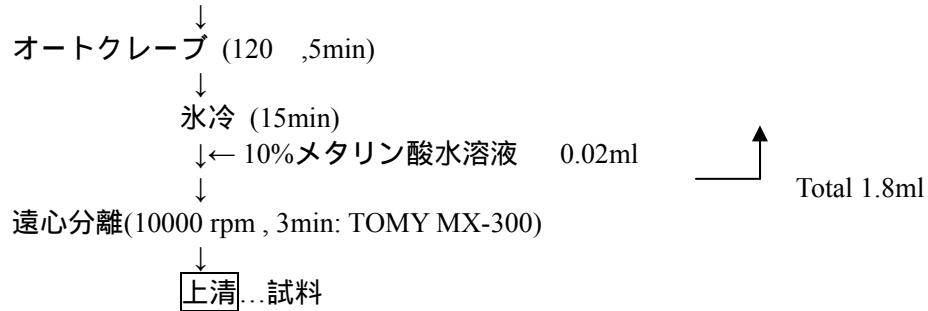


図2 . 尿中のビタミン B₁₂ 定量用試料の作成方法

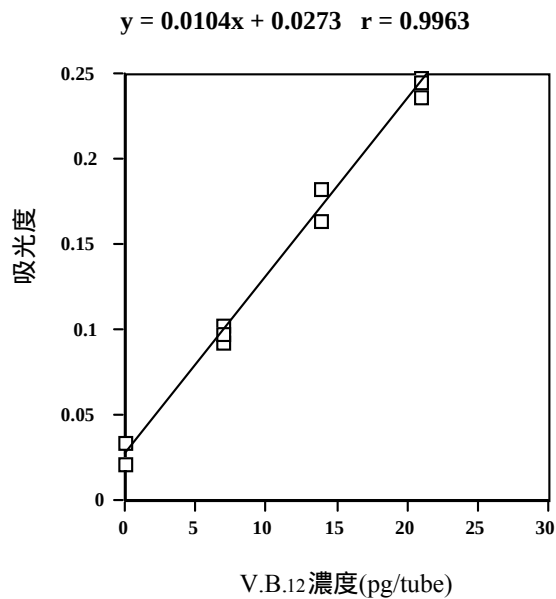


図3 . ビタミン B₁₂ 定量のための検量線の一例

食品

↓ 超純水を加え，ミキサーで液状にし，重量（a）を測定した．

食品ホモジネイト	0.5 g
0.57M 酢酸緩衝液（pH 4.5）	2.5ml
超純水	5ml
0.05% KCN	0.1ml

CENTRIFUGE TUBE (15ml :SUMILON)

↓
抽出（沸騰水浴中，5min）
氷冷（15min）

↓← 10%メタリン酸水溶液 0.15ml
メスアップ（10ml ，超純水）

↓
ろ過（FILTER PAPER 2，110mm）

V.B₁₂ 測定用試料 ..A

V.B₁₂ 約 0.015ng/ml

含むように適宜希釈して使用．

計算ページに例あり

アルカリ耐性因子測定用 1.5 ml

↓← 1M NaOH 200μl

↓（pH11～12 にする）

オートクレーブ（120℃，5min）

↓
氷冷（15min）

↓
遠心分離（10,000 rpm，3min：TOMY MX-300）

↓
上清...アルカリ耐性因子
測定用試料 ..B

図4．食品中のビタミン B₁₂ 定量用使用の作成方法

表 1 . ライヒマニ保存用培地の組成 (100ml 分)

酵母エキス	0.85g
ペプトン	0.85g
ブドウ糖	1.10g
リン酸二水素カリウム	0.20g
トマトジュース粉末	0.37g
ポリソルベート 80	0.10g

表 2 . ビタミン B₁₂ 定量用基礎培地 (基礎培地 2 倍濃度 1ml 中の量)

カザミノ酸	15mg	塩酸ピリドキシン	4 µg
L-シスチン	400µg	塩酸ピリドキサール	4 µg
DL-トリプトファン	400µg	塩酸ピリドキサミン	800ng
硫酸アデニン	20µg	葉酸	200ng
塩酸グアニン	20µg	リン酸二水素カリウム	1 µg
ウラシル	20µg	リン酸一水素カリウム	1 mg
キサンチン	20µg	硫酸マグネシウム	400µg
塩酸チアミン	1 µg	硫酸第一鉄	20µg
リボフラビン	1 µg	硫酸マンガン	20µg
ビオチン	10ng	L-アスパラギン	200µg
ニコチン酸	2 µg	ブドウ糖	40mg
パラアミノ安息香酸	2 µg	酢酸ナトリウム (無水)	20mg
パントテン酸カルシウム	1 µg	アスコルビン酸	4mg

表 3 . ビタミン B₁₂ 定量操作方法

V.B ₁₂ (pg/ tube)	0.1ng/ml V.B ₁₂ 標準(μl)	超純水 (μl)	0. 1M KPB pH 6.2 (μl)	2 倍濃度定量用基 礎培地 (ml)	Total (ml)
0	-	800	200	1	2
5	50	750	↓	↓	↓
10	100	700	↓	↓	↓
15	150	650	↓	↓	↓
20	200	600	↓	↓	↓
30	300	500	↓	↓	↓
40	400	400	↓	↓	↓
ヒト 尿	400	400	↓	↓	↓
ラット 尿	50	750	↓	↓	↓
食品サンプル	100	600	400	↓	↓
アルカリ耐性	100	600	↓	↓	↓