

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

7. 葉酸

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用した葉酸の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1. 微生物定量方法による尿中葉酸測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.1Mリン酸緩衝液(pH6.1)

$\text{KH}_2\text{PO}_4=136.09$, $\text{NaOH}=40.00$, L(+)-アスコルビン酸=176.13
(全て和光純薬工業株式会社, 室温保存)
 KH_2PO_4 13.61g, NaOH 1.89g, L(+)-アスコルビン酸5gを水1000mlに加えてpH6.1に調製する。
約5日間冷蔵保存可能

0.9%滅菌NaCl

$\text{NaCl}=98.08$
(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。

葉酸標準液

葉酸標準原液(0.2mg/ml)
葉酸(Folic Acid)=441.40 (和光純薬工業株式会社, 遮光冷蔵保存)
1) 葉酸0.005gを秤量し, 0.1N NaOH 0.5mlを加え, 溶解し, 水で25mlにメスアップする。
遮光冷蔵下で1ヶ月保存可
2) 吸光度を測定する。対照セルには水を入れる。 $\text{OD}_{282}=27,600$ から正確な濃度を計算する。このスペクトルを図1に示した。
0.1N NaOH
 $\text{NaOH}=40.00$ (和光純薬工業株式会社)
 NaOH を0.4g秤量し, 超純水を加え溶解し,

100mlにメスアップする。

葉酸標準液(1ng/ml) 当日調製
葉酸標準原液(0.2mg/ml)を水で希釈し, 10ng/mlに調整する。

- 1) 標準原液50μlに対し超純水950μl(20倍希釈) → 10μg/ml
- 2) 1)10μlに対し超純水990μl(100倍希釈) → 100ng/ml
- 3) 2)500μlに対し超純水4500μl(10倍希釈) → 10ng/ml

保存用培地, 液体用培地

「Brain Heart infusion Broth」
(日本製薬株式会社, 室温保存)を使用。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) 培地を3.5g, 寒天1.5gを秤量し, 超純水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解させる。
2) 冷ました後, 100mlにメスアップする。
3) 培地を約5mlずつねじ口試験管(15ml容)に分注し, 軽く蓋をして5分間, 121℃, プラス1気圧でオートクレーブした後, 室温にして放置して固める。その際, 半分は垂直に立てて冷却し(保存用培地), 残りの半分は斜めにして固める(斜面培地)。

液体培地

「Brain Heart infusion Broth」
(日本製薬株式会社, 室温保存)を使用。組成を表1に示した。
1) 培地3.5gを秤量し, 超純水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解させる。
2) 冷ました後, 100mlにメスアップする。
3) 微生物定量用試験管(12×100mm)に5ml

ずつ分注し、アルミキャップをして、5分間、121℃、プラス1気圧でオートクレーブにかけた後、氷冷する。冷蔵保存。

葉酸定量用培地

葉酸定量用培地

(日本製薬株式会社、冷蔵保存)その組成を表2に示した。

培地を11.4gを秤量し、水を加え、沸騰水浴中で完全溶解後、100mlにメスアップする。

1-2. 試料調製方法

- ・ビタミン摂取無しの尿 100μl
- ・ビタミン摂取(所要量の3～6倍量)有りの尿 50～200μl

1-3. 定量操作方法

接種用菌の作成方法

- 1) *Streptococcus faecalis* R, (*Enterococcus hirae*) の植えてある保存用培地から菌体を白金耳で取り、斜面培地に塗布する。30℃で24時間培養する。
- 2) 培養した斜面培地から菌体を白金耳で取り、新しい斜面培地に塗布する。30℃で24時間培養する。
- 3) 作成した液体培地に斜面培地から菌体を白金耳で取り、30℃、18～24時間培養する。
- 4) 液体培地に培養してある菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離(3000rpm, 10分間)し、沈殿部分の菌体を得る。
- 5) 菌体に0.9%滅菌NaCl、5mlに懸濁し、遠心分離(3000rpm, 5-7分間)後、再び0.9%滅菌NaCl、5mlで洗浄する。この操作を計3回行う。
- 6) 最終的に集めた菌体を0.9%滅菌NaCl、5mlに懸濁させる。さらにその懸濁液50μlを0.9%滅菌NaCl 5mlに懸濁させる。これを接種用菌とする。

定量操作

- 1) 表3の溶液を定量用試験管(12×75mm)に分注する。検量線用、試料共に3連で行うが、No.0は1本のみで、菌を接種しないこと。(雑菌の繁殖がないことを確認するため)
- 2) 分注した試験管にキャップをし、オートクレーブ(5分間、121℃、プラス1気圧)後、氷冷する。
- 3) 調整した接種用菌を50μlずつ分注する(無菌

操作)。

- 4) 30℃、18～24時間培養する。
- 5) 分光光度計を660nmの波長にし、No.0の欠菌の試験管で0合わせを行う。
- 6) 全ての試験管の吸光度を測定する。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、未知試料中の葉酸濃度を算出する。
標準の検量線の一例を図2に示した。

1-4. 計算方法

検量線から標準の方程式を求める。(y=ax+b)

一日の尿中葉酸排泄量(μg/day)

$$= [(\text{試験溶液の吸光度} - b) / a] / \text{試験溶液中の尿量 (ml)} \times \text{希釈倍数} \times \text{一日尿量 (ml)} \times 1/1000$$

(例) ヒト(通常食)尿

$$[(0.079 - 0.024) / 0.218] / 0.1 \times 825 \times 1/1000 = 2.079 \mu\text{g/day}$$

$$0.079 = \text{吸光度}, y = 0.218x + 0.024, 825 = \text{全尿量}$$

2. 微生物定量法による食品中の葉酸測定方法

2-1. 試薬作成方法

プロテアーゼ溶液 (200U/ml) 当日調製
プロテナーゼMS (20,000U/0.5g包) (科研製薬、室温保存)
プロテアーゼ0.5g包を水200mlに加え、溶解させる。

コンジュガーゼ溶液

1N HCl溶液

Hydrochloric Acid = 36.46

(和光純薬工業株式会社、室温保存)

Assay 35.0～37.0%, 比重 1.18]

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

$$424.8 / 36.5 = 11.6 \text{ mol / L} \cdots 1\text{Lに含まれる塩酸のモル濃度}$$

HClを1ml取り、超純水を115ml加えてよく混和した。

1N NaOH溶液

NaOH=40.0

(和光純薬工業株式会社、常温保存)

NaOHを4gを秤量し、超純水を加え溶解させ、100mlにメスアップした。

イオン交換樹脂 (Dowex 1X8) 当日調

製

- 1) Dowex 1X8 (ムロマチテクノス株式会社)
Dowex 1X8 を10g秤量し 1N HCl 100ml (Dowexの10倍量) で10分間攪拌し, 十分に水で洗いながら, 濾紙を用いて濾過する.
- 2) 1N NaOH 100ml (Dowexの10倍量) で再度10分間攪拌し, 1N HClで洗いながら濾過する.
- 3) pH試験紙で確認しながら, 水で中性を示すまで洗う.

0.02Mシステイン塩酸塩溶液 (pH5.58)
L-システイン塩酸塩一水和物= 175.64
(和光純薬株式会社, 室温保存)
L-システイン塩酸塩一水和物0.351gを秤量し, 超純水を加え, 1N NaOHでpH5.58に調製した後に, 超純水で100mlにメスアップする.

コンジュガーゼ溶液の調製方法
図3にコンジュガーゼ溶液の調製方法を示した.

定量用培地

Folic Acid Casei Medium (Sigma, 冷蔵保存)
その組成を表4に示した.
培地を11.4gを秤量し, 水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解後, 100ml定容.

保存用培地, 斜面培地

一般乳酸菌用培地
(日本製薬株式会社, 室温保存). その組成を表5に示した.

- 寒天 (Agar, Powder)
(和光純薬工業株式会社, 室温保存)
- 1) 培地を3.96g, 寒天1.5gを秤量し, 超純水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解させる.
 - 2) 冷ました後, 100mlにメスアップする.
 - 3) 培地を約5mlずつねじ口試験管 (15ml容) に分注し, 軽く蓋をして5分間, 121℃, プラス1気圧でオートクレーブした後, 室温にして放置して固める. その際, 半分は垂直に立てて冷却し (保存用培地), 残りの半分は斜めにして固める (斜面培地).

液体培地

- 一般乳酸菌用培地
(日本製薬株式会社, 室温保存)
- 1) 培地3.96gを秤量し, 超純水を加え, 沸騰水

浴中で完全溶解させる.

- 2) 冷ました後, 100mlにメスアップする.
- 3) 微生物定量用試験管 (12×100mm) に5mlずつ分注し, アルミキャップをして, 5分間, 121℃, プラス1気圧でオートクレーブにかけた後, 氷冷する. 冷蔵保存.

2-2. 試料調製方法

試料作成方法を図4に示した.

2-3. 定量操作方法

接種用菌の作成方法

- 1) *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus casei*), ATCC 2773の植えてある保存用培地から菌体を白金耳で取り, 斜面培地に菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後, 遠心分離 (3000rpm, 10分間) し, 沈殿部分の菌体を得る.
- 2) 菌体に0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁し, 遠心分離 (3000rpm, 5-7分間) 後, 再び0.9%滅菌NaCl, 5mlで洗浄する. この操作を計3回行う.
- 3) 最終的に集めた菌体を0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁させる. さらにその懸濁液50μlを0.9%滅菌NaCl, 5mlに懸濁させる. これを接種用菌とする.

定量操作

- 1) 表6の溶液を定量用試験管 (12×75mm) に分注する. 検量線用, 試料共に3連で行うが, No.0は1本のみで, 菌を接種しないこと. (雑菌の繁殖がないことを確認するため)
- 2) 分注した試験管にキャップをし, オートクレーブ (5分間, 121℃, プラス1気圧) 後, 氷冷する.
- 3) 調整した接種用菌を50μlずつ分注する (無菌操作).
- 4) 37℃, 22~24時間培養する.
- 5) 分光光度計を660nmの波長にし, No.0の欠菌の試験管で0合わせを行う.
- 6) 全ての試験管の吸光度を測定する. 標準溶液の吸光度から検量線を作成し, 未知試料中の葉酸濃度を算出する. 検量線の一例を図5に示した.

2-4. 計算方法

検量線から標準の方程式を求める. ($y=ax+b$)
各食事の葉酸含量 (μg/day)

$$= [(\text{試料溶液の吸光度} - b) / a] / \text{試料溶液量 (ml)}$$
$$\times 50 \text{ ml} \times \text{試料重量 (ml)} \times 1 / 1000$$

50ml：試料作成時の定容量

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

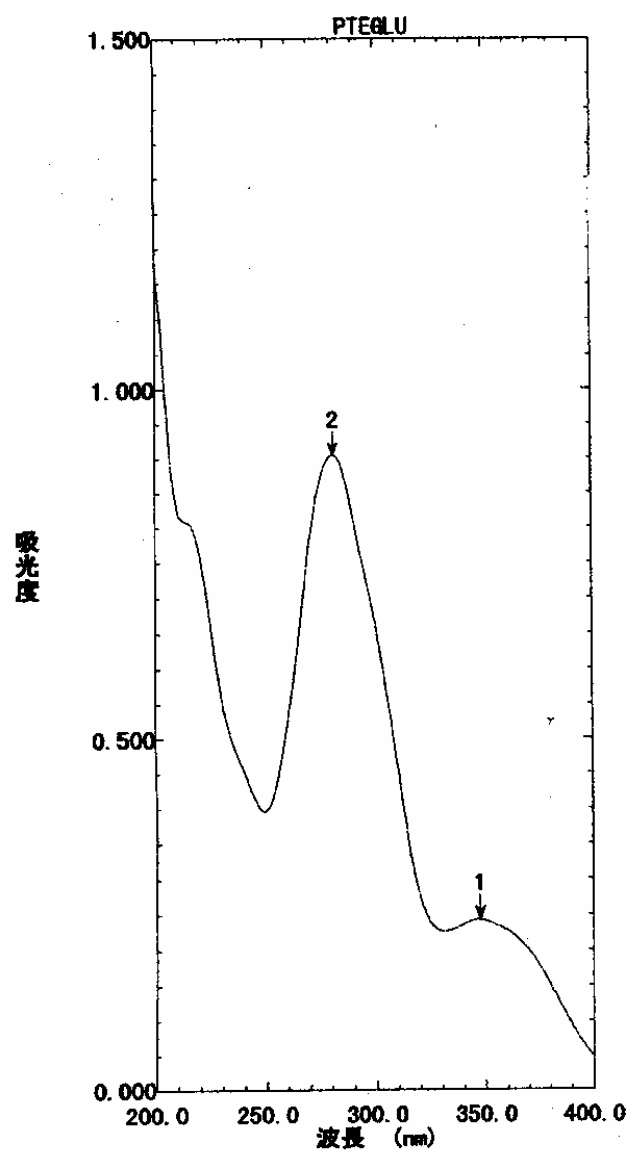
なし

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	347.80	0.2422
2	281.00	0.9044

$$\epsilon_{282} = 27600$$

$$0.9044 / 27600 = 3.28 \times 10^{-5} \text{M}$$

原液を 15 倍希釈したので

$$3.28 \times 10^{-5} \times 15$$

$$= 49.2 \times 10^{-5} \text{M}$$

PteGlu 分子量 441.40 より

$$49.2 \times 10^{-5} \times 441.40$$

$$= 0.217$$

$$\approx 0.22 \text{ mg / ml}$$

図 1 . 葉酸標準溶液の吸収スペクトルの一例

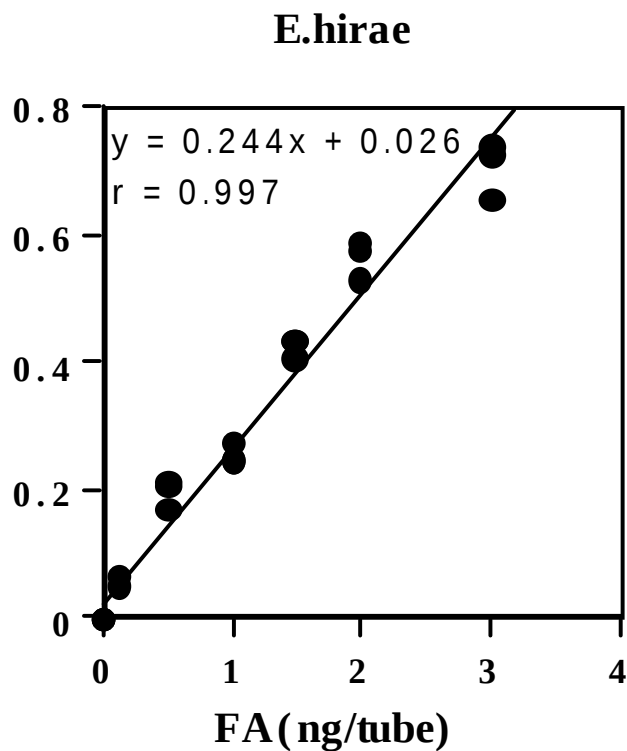


図 2 . 葉酸定量のための検量線の一部 (*E. hirae* を検定菌とした時)

コンジュガーゼ溶液調製方法

KEDNY ACETON POWDER (Sigma, Poricin, Type , 冷凍保存)

0.02M システイン塩酸塩溶液 (pH5.58)

↓ 氷冷しながら攪拌 (1 ~ 2 時間)

↓ 冷却遠心分離 (10,000rpm, 4 , 10 分間)

上清

↓ 冷却遠心分離 (10,000rpm, 4 , 5 分間)

上清

↓ ← Dowex 1x8 (Cl⁻) (10g/ 100m)

↓ 攪拌 , 30 分間

↓ 冷却遠心分離 (10,000rpm, 4 , 10 分間)

↓ 濾過

上清=コンジュガーゼ溶液 小分けして , -20 にて数年間保存可能

図 3 . コンジュガーゼ溶液の調製方法

食品中処理法

試料 1 ~ 2g

0.1M リン酸緩衝液 (pH6.1)

↓

オートクレーブ (121℃, プラス 1 気圧, 5 分間)

↓

氷冷

↓←プロテアーゼ溶液 5ml

保温, 37℃, 2 ~ 3 時間

↓

加熱, 100℃, 10 分間

↓

氷冷

↓←コンジュガーゼ溶液 0.5ml

↓←システイン 12.5mg

保温, 37℃, 15 ~ 20 時間

↓

加熱, 100℃, 10 分間

↓

氷冷

↓ 冷却遠心分離 (12,000rpm, 4℃, 10 分間)

上清

↓

定容 50ml, 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.1)= 試料

図 4 . 食品中の葉酸測定のための試料作成方法

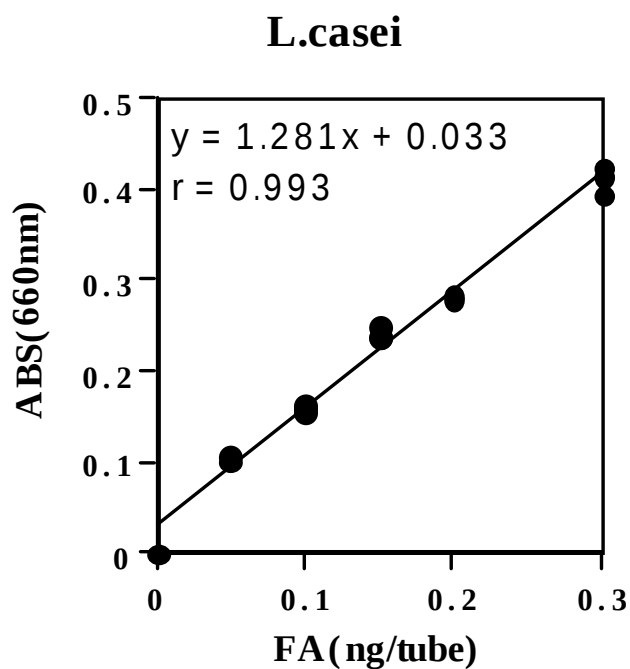


図 5 . 葉酸測定のための検量線の一例 (*L. casei* を検定菌とした時)

表 1 . Brain heart infution 培地

試薬	重量 (g)
牛脳エキス末	7.5
ハートエキス末	8.0
ペプトン	10.0
ぶどう糖	2.0
塩化ナトリウム	5.0
リン酸一水素カリウム	2.5

表 2 . 葉酸定量用培地の組成 (1 L 分)

試薬	重量 (g)
カザミノ酸	10
L-システイン	0.76
L-トリプトファン	0.2
L-アスパラギン	0.6
硫酸アデニン	0.01
硫酸グアニン	0.01
ウラシル	0.01
キサンチン	0.02
グルタチオン	0.0052
塩酸チアミン	0.0004
リボフラビン	0.001
塩酸ピリドキシン	0.004
ニコチン酸	0.0008
パントテン酸カルシウム	0.0008
p-アミノ安息香ビオチン酸	0.001
ビオチン	0.00002
リン酸一水素カリウム	6.4
硫酸マグネシウム	0.4
硫化第一鉄	0.02
硫酸マンガン	0.22
クエン酸ナトリウム	62.0
ブドウ糖	40
ポリソルベート 80	0.1

表 3 . *Streptococcus faecalis* R (*Enterococcus hirae*)を使用する場合の標準，試験溶液

No.	FA final conc (ng/tube)	10ng/ml FA (μ l)	H ₂ O (μ l)	0.1M リン酸 Buffer (μ l)	Medium (ml)	Total (ml)
0	0.00	0	800	200	1	2
1	0.10	10	790	↓	↓	↓
2	0.50	50	750			
3	1.00	100	700			
4	2.00	200	600			
5	3.00	300	500			
6	4.00	400	400			
7	5.00	500	300			
Sample	x	(*)	800 - *	↓	↓	↓

* : 尿 50 ~ 200 μ l

表 4 . Folic Acid Casei Medium の組成 (1 L 分)

試薬	重量(g)
カゼイン	10
デキストロース	40
酢酸ナトリウム	40
リン酸二水素カリウム	1
リン酸一水素カリウム	1
L-アスパラギン	0.6
L-システイン-HCl	0.5
硫酸マグネシウム (無水)	0.2
DL-トリプトファン	0.2
ポリソルベート 80	0.1
キサンチン	0.02
塩化ナトリウム	0.02
硫酸第一鉄	0.02
硫酸マグネシウム	0.015
硫酸アデニン	0.01
グアニン-HCl	0.01
ウラシル	0.01
グルタチオン	0.005
塩酸ピリドキサル	0.004
p-アミノ安息香酸	0.002
リボフラビン	0.001
パントテン酸カルシウム	0.0008
チアミン塩酸塩	0.0004
ビオチン	0.0002

表 5 . 一般乳酸菌用培地組成

試薬	重量 (g)
酵母エキス	5.5
酢酸ナトリウム	10.0
ペプトン	12.5
硫酸マグネシウム	0.1
ブドウ糖	11.0
硫酸マンガン	0.005
リン酸二水素カリウム	0.00025
硫化第一鉄	0.005
リン酸一水素カリウム	0.00025

表 6 . *L.casei* を使用する場合の標準, 試験溶液

No.	FA final conc (ng/tube)	1ng/ml FA (μl)	H ₂ O (μl)	0.1M リン酸 Buffer (μl)	Medium (ml)	Total (ml)
0	0.00	0	800	200	1	2
1	0.05	50	750			
2	0.10	100	700			
3	0.15	150	650			
4	0.20	200	600			
5	0.25	250	550			
6	0.30	300	500			
7	0.40	400	400			

Sample x (*) 800- *

* : 試料溶液 50 ~ 600μl