

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

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

8．ビオチンの定量方法

研究要旨

本研究で使ったビオチン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ビオチン測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.5M KPB (pH7.0)

1) 0.5 M KH_2PO_4

$\text{KH}_2\text{PO}_4=136.09$

(和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.5 \times 136.09 \times 500/1000 = 34.609 \text{ g}$

34.6g 秤量し, 超純水を加え溶解させ, 500ml 定容．

2) 0.5 M K_2HPO_4

$\text{K}_2\text{HPO}_4=174.18$

(和光純薬株式会社, 室温保存)

$0.5 \times 174.18 \times 500/1000 = 43.545 \text{ g}$

43.5g 秤量し, 超純水を加え溶解させ, 500 定容．

3) 1)に 2)を加え pH7.0 に調製．

ビオチン標準原液 (冷凍保存)

(+) – Biotin = 244.31

(和光純薬工業株式会社, 2～10℃・遮光保存)

ビオチン 0.05 g を 50%エタノール溶液 50 ml に溶解し、これを原液 (1 mg / ml) とした。

ビオチン標準溶液 (冷凍保存)

ビオチン標準原液を超純水で希釈し、

1 ng / ml の濃度に調整する。

1) ビオチン標準原液 (1 mg / ml) 10 μ l に対し, 超純水 990 μ l (100 倍希釈) → 10 μ g / ml

2) 1)10 μ l に対し超純水 990 μ l (100 倍希釈) → 100 ng / ml

3) 2)10 μ l に対し超純水 990 μ l (100 倍希釈) → 1 ng / ml

0.9%滅菌 NaCl

NaCl=98.08 (和光純薬株式会社, 室温保存)

1) NaCl 4.5g 秤量し超純水を加えて溶解さ

せ, 500ml 定容．

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, 冷蔵保存する．

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 1 に示した．

寒天 (Agar, Powder)

(和光純薬工業株式会社)

1) 培地を 3.6g, 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 3.6g 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．

ビオチン定量用培地 当日作成

ビオチン定量用培地 (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 7.7g を秤量し, 超純水を加え, 沸騰水

浴中で完全溶解後，100ml 定容．

1-2. 試料作成方法

尿を遠心分離（2000rpm,5min 卓上本架遠心機 TOMY LC-122）し，必要に応じて超純水で希釈．

（例）ヒト尿→4 倍,ラット尿→原液

*10 μ l を試料として使用する．

1-3. 定量操作方法

接種用菌の作成方法

- 1) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 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 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 0.05ml を 0.9%滅菌 NaCl，5ml に懸濁させる．これを接種用菌とする．
長期間測定を行わない場合は液体培地中で培養した *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 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、冷蔵庫で保存する(約 3 ヶ月保存可能，一ヶ月毎に継代するとよい)．

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 50 μ l ずつ分注する(無菌操作)．
- 4) 37 ，21 時間前後培養する．
- 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 1 に示した．

1-4. 計算方法

検量線より試料中のビオチン量 (ng / tube)

を求める．

尿中ビオチン量 (ng / day)

= ビオチン (ng / tube) / 10 μ l×10³×(全尿量・ml)×試料希釈倍数

10 μ l = 試験管に入れた尿量

10³ = 位を μ l から ml にした．

（例）

1. ヒト尿（通常食）

[(0.358-0.048)/3.487] / 10×10³×914×8= 6500ng/day

吸光度=0.358，y=3.487x+0.048，全尿量 914ml，希釈倍数=8

2. ラット（通常食：20%カゼイン食）尿

[(0.127 - 0.022) / 2.355] / 10×10³×25 = 111ng/day

吸光度=0.127，y=2.355x+0.022，全尿量 25ml

2. 微生物定量法による食品中のビオチン定量測定方法

2-1. 試薬作成法

2.25 M 硫酸

H₂SO₄ = 98.08 (和光純薬工業株式会社，室温保存)

98.08 (mol / l)× 2.25 (M)× 10⁻³ × 10(ml) = 2.2068

H₂SO₄ 2.207 g を秤量し，超純水で 10 ml 定容．

ビオチン標準液，0.5MKPB buffer (pH7.0)，保存用培地，斜面培地，液体培地，定量用培地，0.5%滅菌 NaCl は 1-1.試薬作成方法と同様．

2-2. 試料作成方法

図 2 に食品中のビオチンを遊離させる方法を示した．

2-3. 定量操作方法

1-3.定量操作方法と同様．

2-4. 計算方法

検量線より試料中のビオチン量 (ng / tube) を求める．

食事中ビオチン量 (ng) = ビオチン (ng/tube) ×試料希釈倍数×A / B×C / D

A：ミキサー後食事全重量(g)

B：処理に使った液状食事全重量(g)

C：(液状食事 1 g +水 1 ml+ 2.25 M 硫酸 1 ml) の合計重量(g)

D：(d)の比重から求めた試料重量(g) / 10 μ l

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

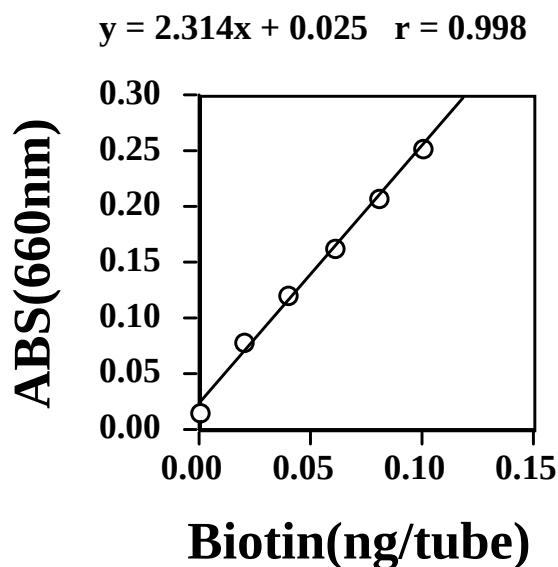


図 1 . ビオチン定量のための検量線の一例

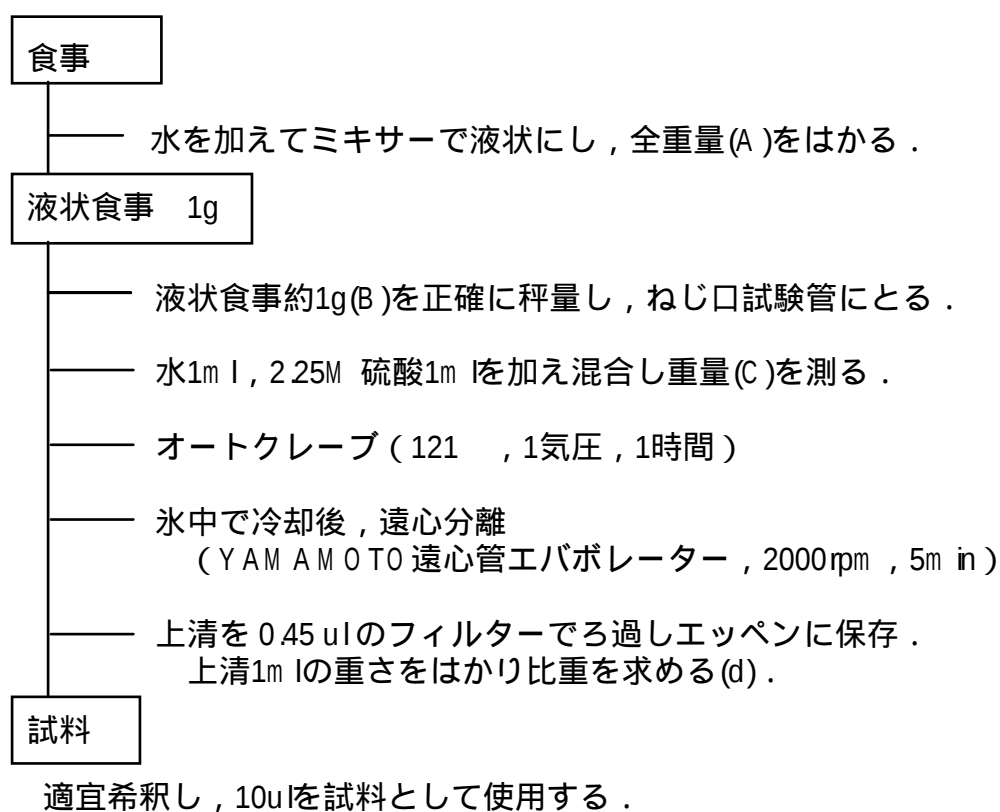


図 2 . 食品中の結合型ビオチンの遊離化操作方法

表 1 . 一般乳酸菌用培地の組成

試薬	重量 (g)
酵母エキス	5.5
ペプトン	12.5
ブドウ糖	11.0
リン酸二水素カリウム	0.25
リン酸一水素カリウム	0.25
酢酸ナトリウム	10.0
硫酸マグネシウム	0.1
硫酸マンガン	0.1
硫酸第一鉄	0.005

表 2 . ビオチン定量用培地の組成 (1L 分)

試薬	重量 (g)
カザミノ酸	14
L-シスチン	0.4
DL-トリプトファン	0.2
硫酸アデニン	0.02
塩酸グアニン	0.02
ウラシル	0.02
塩酸チアミン	0.0002
リボフラビン	0.0004
p-アミノ安息香酸	0.0002
パントテン酸	0.0004
ニコチン酸	0.001
塩酸ピリドキシン	0.0008
リン酸二水素カリウム	1
リン酸一水素カリウム	1
硫酸マグネシウム	0.4
硫酸第一鉄	0.02
硫酸マンガン	0.02
酢酸ナトリウム (無水)	20
ブドウ糖	40

表 3 . ビオチンの定量操作方法

試験管 No.	ビオチン量(ng / tube)	2 倍濃度基礎 培地(ml)	1ng/ ml biotin 標 準液 (μ l)	0.5M KPB pH7.0(μ l)	超純水 (μ l)
1	0	1	0	200	800
2	0.02	1	20	200	780
3	0.04	1	40	200	760
4	0.06	1	60	200	740
5	0.08	1	80	200	720
6	0.1	1	100	200	700
Sample	x	1	10	200	790