

高速液体クロマトグラフィーによる 尿中リボフラビンの測定

Determination of Urinary Riboflavin by High-performance Liquid Chromatography

(2000年3月31日受理)

嶋田 義弘
Yoshihiro Shimada

Key words : High-performance Liquid Chromatography, Riboflavin, Urine, Creatinine,
Biological monitoring

Abstract

The possibility of monitoring for vitamin B₂ by determining urinary riboflavin was investigated using high-performance liquid chromatography with fluorescence detector.

The following results were obtained.

1. Urinary excretion of riboflavin reached its maximum values in 2 hours after oral administration of riboflavin.
2. After 3 hours, a linear relationship ($r=0.985$) existed between the total amount of urinary riboflavin and the dose of riboflavin administered orally.
3. After 3 hours, a linear relationship ($r=0.999$) existed between the urinary riboflavin value corrected by urinary creatinine and the dose of riboflavin administered orally.

From the results as described above it was suggested that the total amount of urinary riboflavin or urinary riboflavin corrected by creatinine in the urine after 3 hours enables monitoring for vitamin B₂.

緒 言

ビタミンB₂は“発育ビタミン”ともいわれ、主として生体内酸化還元反応や酸素添加反応に作用する酵素（フラビン酵素）の補酵素となり、エネルギー獲得、物質代謝、薬物代謝に関与するビタミンである。生体内では大部分が補酵素型であるフラビンモノヌクレオチド（FMN）およびフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）として存在している。尿中への排泄はリボフラビンが大

部分で、その他に腸内細菌によりリボフラビンから生成する10-ヒドロキシエチルフラビンとその誘導体が認められ、リボフラビニルグルコシドの排泄もみられる。FMNやFADは体内でホスファターゼの加水分解により尿中排泄はみられない。

このビタミンの充足度を判定しようとする生体成分による生物学的モニタリングには、血液中の総ビタミンB₂量の測定や赤血球グルタチオン還元酵素活性の測定^{1, 2)} などがあるが、尿に排泄されるリボフラビン量を測定する方法が、このビタミンの食事からの摂取量をモニタリング監視し、個人のビタミンB₂状態を確立する理想的な方法であるといわれている^{3, 4)}。

そこで今回、尿中のリボフラビン量を、検出に蛍光光度計を備えた高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) による非常に簡便で良感度の測定法により、尿中リボフラビンによる、より手軽な摂取量のモニタリングの可能性を検討した。

方 法

1. 試料尿

排泄の時間経過をみる場合は、男性 (46歳) がビタミンB₂リン酸エステルを19mg含有の錠剤 (リボフラビンとして15.7mg) を服用した後に、10時間後までは1時間毎に採尿し、その後は1時間から2時間15分間隔で14時間まで採尿した。投与量と排泄量の関係を見る実験では、食事から3時間後に放尿し、その1時間後にビタミンB₂をそれぞれ1.8mg, 1.35mg, 0.9mg, 0.45mgを水に溶解して服用し、同時に採尿した。服用時と服用後3時間の尿について、リボフラビンとクレアチニンを測定した。

2. リボフラビンの定量

関らの方法^{4, 5)} に準じて測定した。50%メタノールで2倍希釈し、3000rpmで15分間遠心分離した後に、含有量に応じて水でさらに1~100倍に希釈後、DISMIC-13cp Cellulose Acetate フィルター (0.20 μm) で濾過してHPLCにかけた。HPLC条件は、装置: Shodex DS-4, 移動相: 1 Mプロピオン酸緩衝液 (水酸化ナトリウムでpH4.4に調整), カラム: Asahipak GS-320H (0.76 × 25cm), カラム温度: 50℃, 検出器: HITACHI F-1080 Fluorescence Detectors, 検出: 励起波長450nm, 測定波長530nm, 流速: 1.2ml/min, 注入量: 20 μl (Rheodyne Model7125インジェクター), 定量解析: SICクロマトコーダー12で行った。

3. クレアチニンの定量

嶋田らの方法⁶⁾ により測定した。尿を水で25倍希釈した後に、DISMIC-13cp Cellulose Acetate フィルター (0.20 μm) で濾過してHPLCにかけた。HPLC条件は、装置: Shodex DS-4, カラム: Shodex RSpak DE-613 (150mm × 6mm i.d.), カラム温度: 30℃, 移動相: 3 mM臭化テトラ-n-ブチルアンモニウムを含有した8 mMリン酸緩衝液 (pH6.8), 流量: 1.2ml/min., 検出

器：Shodex UV-41, 検出：UV265nm, 注入量：20 μ l (Rheodyne Model7125インジェクター), 定量解析：SIC480データステーションにより行った。

結果と考察

1. リボフラビンの分離

リボフラビンの標準品およびリボフラビンを服用後の尿のクロマトグラムをFig. 1に示した。リボフラビンのピークのリテンションタイムは約17分であり、それはほかのピークとは重ならないものであった。

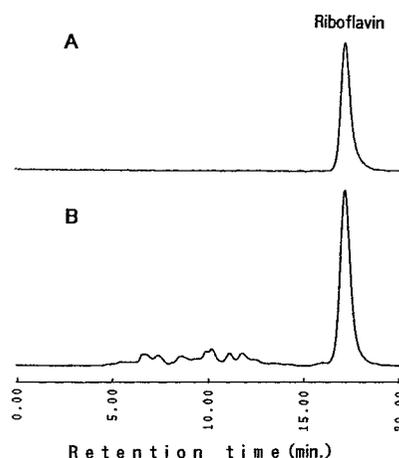


Fig.1 Chromatograms of (A) standard riboflavin (0.05 μ g/ml), (B) urine after oral administration of riboflavin.

2. 検量線および検出限界

Fig. 2に検量線を示した。注入量とピーク面積が0.2 μ g/mlまでの範囲でよい直線性が得られた。またこの検量線から検出限界を、ブランク信号にブランクの標準偏差の3倍を加えたものに等しい信号を与える分析種濃度とした場合として求めると5.18ng/mlであった。尿を50%メタノールで希釈するだけで直接HPLCに注入し、リボフラビンを分離定量することができる本方法は非常に簡便で高感度な測定法であった。

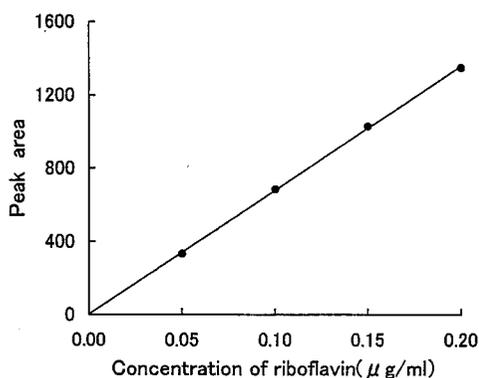


Fig.2 Calibration curve for riboflavin.

3. 尿中排泄の時間経過

ビタミンB₂リン酸エステルを19mg含有（リボフラビンとして15.7mg）のビタミン錠を服用した後の尿中のリボフラビンを測定した結果をFig. 3に示した。服用後2時間尿で最も排泄量が多く、測定した14時間の間の全排泄量の81%が排泄されていた。3時間では既に2時間尿の1/50

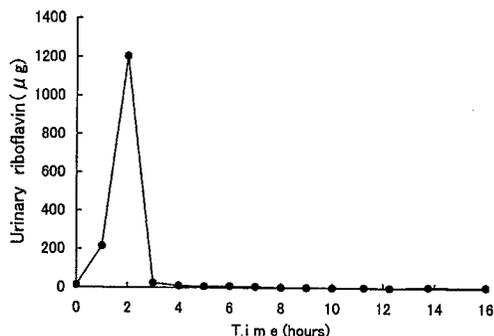


Fig.3 Urinary excretion of riboflavin after oral administration of 15.7mg riboflavin.

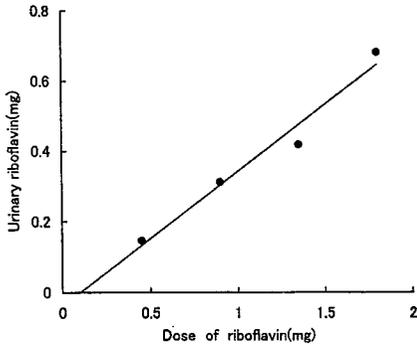


Fig.4 Relationship between the dose of riboflavin administered orally and the amount of riboflavin excreted in urine.

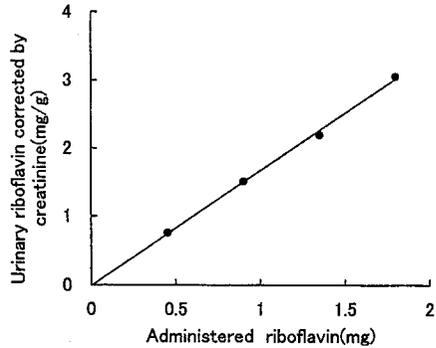


Fig.5 Relationship between the dose of riboflavin administered orally and the urinary riboflavin corrected by creatinine.

にまで減少していた。その後は測定した14時間までほとんど変化なく少量の排泄が続いた。また服用後3時間までの尿で、14時間全排泄量の97.6%が排泄されていた。よってモニタリングのためには食事などによるビタミンB₂摂取後3時間目の尿中のリボフラビン量を測定すれば可能と思われる。これは筆者らのビタミンCの尿中排泄⁷⁾と比較すると、排泄のピークが2時間目と早く、またその2時間尿でほとんどが排泄されており、排泄が短時間で終わる特徴が認められた。

4. 服用量と尿中排泄量の関係

リボフラビン投与量と尿中排泄量の関係をFig. 4 に示した。服用量0.45～1.8mgの範囲で尿中排泄量との間に相関係数0.985の直線性が認められた。また尿中排泄量をクレアチニン補正值として図示すると (Fig. 5), この場合は相関係数が0.999となり、さらに直線性がよくなった。これはビタミンB₂摂取量のモニタリングに際して、全尿を採取しなくてもスポット尿によるクレアチニン補正值を計算するとことにより正確なモニタリングができる可能性を示唆するものである。運動時のビタミンB₂の必要量^{2, 8)}も研究されているが、クレアチニン補正により比較検討することがより良い方法であると思われる。

要 約

蛍光検出器を使った高速液体クロマトグラフィーによる簡便で高感度な方法を使い、尿中に排泄されるリボフラビンによるビタミンB₂の摂取状態のモニタリングの可能性を検討した結果次のような結果を得た。

1. リボフラビン服用後2時間目の尿中に、全排泄量の81%が排泄された。
2. リボフラビン服用後3時間の全尿で、リボフラビン服用量と尿中排泄量との間に相関係数0.985の直線関係が認められた。
3. リボフラビン服用後3時間のスポット尿で、服用量と尿中排泄濃度のクレアチニン補正值の間

に相関係数0.999の直線性が認められた。

以上の結果から、食事などによるビタミンB₂摂取後3時間の尿中リボフラビン量により、あるいはスポット尿による尿中リボフラビンのクレアチニン補正值から、摂取量のモニタリングが可能となった。

本研究は、平成11年度中国短期大学特別研究助成を受けて行ったものである。

文 献

- 1) Kay E. Lepisto Hunter and Pirkko R.Turkki: Effect of Exercise on Riboflavin Status of Rats. *J. Nutr.*, 2, 298-340, 1987.
- 2) Amy Z Belko, Michael P Meredith, Heidi J Kalkwarf, Eva Obarzanek, Susan Weinberg, Robert Roach, Gwen McKeon, and Daphne A Roe: Effect of exercise on riboflavin requirements : biological validation in weight reducing women. *Am.J.Clin.Nutr.*, 41, 277-277, 1985.
- 3) Vytenis J. Gatautis and Herbert K. Naito: Liquid-Chromatographic Determination of Urinary Riboflavin. *Clin. Chem.*, 27(10), 1672-1675, 1981.
- 4) Tokuichiro Seki, Kohji Noguchi and Yuzo Yanagihara: Determination of riboflavin in human urine by the use of a hydrophilic gel column. *J. Chromatogr.*, 385, 283-285, 1987.
- 5) 関得一郎, 芦田信之, 氏原和代, 岡野洋子, 柿木珠江. 牛乳中のリボフラビンおよびその誘導体の定量. 大阪大学医療技術短期大学部研究紀要 自然科学・医療科学篇 14, 1-4, 1986
- 6) 嶋田義弘, 高 早苗, 緒方正名: 高速液体クロマトグラフィーによる中国野菜中のアスコルビン酸および総アスコルビン酸の定量. 岡山医学会雑誌, 103, 899-903, 1991.
- 7) Yoshihiro Shimada and Sanae Ko : Simultaneous Determination of Urinary Ascorbic Acid and Creatinine by High-performance Liquid Chromatography. *Journal of Chugoku Junior College*, 27, 89-95, 1996.
- 8) L. Rokitzki, A. Sagredos, E. Keck, B. Sauer, and J. Keul: Assessment of vitamin B₂ Status in Performance Athletes of Various Types of Sports. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 40, 11-22, 1994.