

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23500967

研究課題名(和文) HPLCによるビオチンおよび異化生成物の新規高感度測定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new sensitive method for determining biotin and its catabolisms by HPLC

研究代表者

渡辺 敏明 (Watanabe, Toshiaki)

兵庫県立大学・環境人間学部・教授

研究者番号：30091846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：水溶性ビタミンの一つであるビオチンの定量について、標準的な方法が確立していない。ビオチンの異化代謝物であるビオチンスルホキド、ビオチンスルホンおよびビスノルビオチン、およびビオチン欠乏の指標であるヒドロキシイソ吉草酸について、高速液体クロマトグラフィを用いてこれらを同時に測定する方法を検討した。これらの物質に共通のカルボン酸を標識する方法および分離条件を検討した。この結果、蛍光色素で標識した方法がもっとも利用可能であった。しかし、生体試料の分析では夾雑物質が多く含まれているため、試料を濃縮しても低濃度の場合には検出が困難であった。現段階ではこの方法をビオチン測定の標準法として提案できない。

研究成果の概要(英文)：As for biotin which is one of water-soluble vitamins, the standard method for determination has not been established as yet. Biotin sulfoxide, biotin sulfone and bisnorbiotin are excreted in the urine as catabolisms of biotin, and hydroxyisovaleric acid is known as an indicator of biotin deficiency. In this study the analytical method to determine simultaneously these biotin-related substances using a high performance liquid chromatography (HPLC) was studied. The methods labeling the carboxylic acid of these substances and the separation conditions were determined. As a result, the determined method labeled with a fluorescent dye was the most available. However, in the analysis of biological samples, because the contaminants such as proteins are contained much, it was difficult to detect even sample was concentrated. This HPLC method as the standard method for determining biotin and its related substances can not be proposed as yet.

研究分野：栄養学、公衆衛生学

キーワード：ビオチン 異化代謝物 高速液体クロマトグラフィ

1. 研究開始当初の背景

(1) ビオチンは様々な食品に含まれているため、成人ではほとんど食事性ビオチン欠乏症は起こらないとされている。しかし、母乳栄養乳児においては、アトピー性皮膚炎やおむつかぶれ皮膚炎などがビオチン欠乏と関連していることが報告されている。これは母乳のビオチン含量が低いことや乳児の消化機能が未熟であることなどが考えられる。わが国では、人工栄養児において、ビオチンをほとんど含まれない治療用特殊ミルクの摂取によるビオチン欠乏が報告されている。また最近妊娠後期におけるビオチン欠乏が観察されている。このようなことから妊婦におけるビオチン栄養指導の重要性が指摘されている。

(2) ビオチンは生体内において異化代謝され、血清や尿中には異化生成物であるビスノルビオチンやビオチンスルホキッドが含まれている。このため、生体内のビオチン状態を評価するためには、これらのビオチン異化生成物も含めて測定することが不可欠である。

2. 研究の目的

ビオチンの測定法としては、一般に乳酸菌を用いた微生物学的定量法が用いられている。しかし、微生物学的定量法には、感度、特異性や操作性などに種々の問題があることが指摘されている。そこで、本研究では、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を利用して、汎用性が高く、前処理が平易で、より感度の高いビオチンおよびビオチン異化生成物の同時測定法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 分離条件

これまでの研究においては、ビオチンおよび異化代謝物の標準物質を用いて、測定法の条件を検討してきたが、今年度においてはビオチン負荷試料やビオチン含量が高い食品なども用いて検討を行った。

(2) 標準物質

Biotin (BIO), Biotinsulfoxide (BSO), Biotinsulfon (BSF), Bisnorbiotin (BNB), および、ビオチン欠乏の早期指標とされる 3-Hydroxyisovaleric acid (3-HIA) 標準溶液を用いた DMEQ-H による蛍光標識と HPLC の分離条件の確立を試みた。20pg レベルの感度の確認および標識化合物の冷蔵保存で 1 年間の安定を確認した (図 1)。

4. 研究成果

(1) 各種生体試料の測定結果と問題点

尿

・夾雑物が多く、ピークの同定が困難である (図 2)

・感度が低い

血清

・夾雑物が多く、ピークの同定が困難である。

・感度が低い

食品

・食材によって同定が可能である (図 3)

・含有量が高い場合には、測定可能であるがリテンションタイムの変動が大きい。

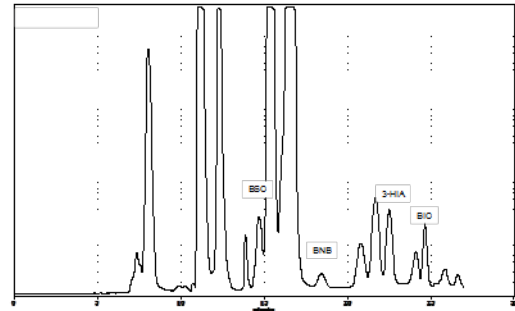


図 1. 標準溶液 (各 50ng) のクロマトグラム

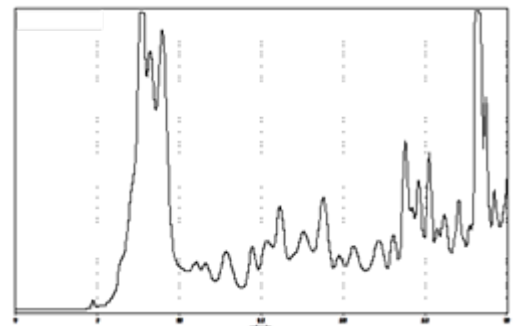


図 2. 尿のクロマトグラム

(2) 夾雑物除去のための試料の測定前処理検討の経過と問題点

市販アビジン樹脂による処理

ビオチンおよびビオチン代謝産物に共通するウレイド環と特異的に結合するアビジンとの強固な結合を利用し、ビオチンとビオチン代謝産物の蛍光標識物との結合力が比較的弱いと予想して、アビジンを変性させることでビオチンおよびビオチン代謝産物の蛍光標識物質を遊離し、HPLC で測定。結果は極めて良好である。しかし、試薬が高価であるため、安価な方法を検討した。

逆相系 C18 の固相抽出による前処理

尿および尿の蛍光標識いずれも夾雑物除去が不十分であった。

イオン交換樹脂と C18 固相抽出との組み合わせ

わせ

若干、夾雑物は少なくなったが、上記と同様に尿および尿の蛍光標識いずれも夾雑物除去が不十分であった(図3)。

合成低分子吸着剤、イオン交換樹脂と C18 固相抽出との組み合わせの概略

尿をセパーズ(吸着剤)に通液 蒸留水洗浄 70%エタノール溶出 減圧乾固 1/15M リン酸緩衝液(pH7)溶解 Dowex1-X2に通液 水洗 0.012Mギ酸溶出 C18 固相通液 水洗 メタノール溶出 減圧乾固 蒸留水溶解 蛍光標識 HPLC インジェクション

前処理は操作が増えるに従って、かなりの夾雑物が除去されてくるが、標準法として確立するためには、まだ不十分である。また、目的物質の検出感度を上げるためには現段階では試料の濃縮が不可欠であるが、夾雑物もまた濃縮されることとなり、妨害ピークとなる。

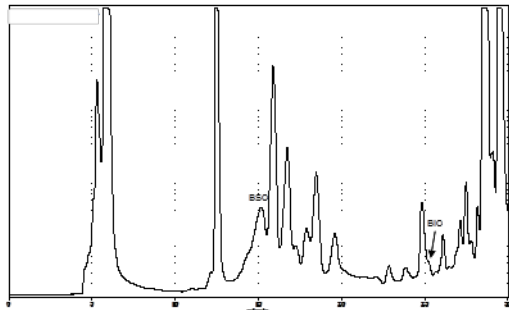


図3 . 市販ローヤルゼリーのクロマトグラム

(3) 今後の課題

本研究において HPLC によるビオチンおよびビオチン異化代謝物の測定法を確立することができなかったが、その課題として下記の点が考えられる。

前処理法

- ・夾雑物除去法の検討
- ・検出感度上昇
- ・各種材料への適用

他の分離カラムの検討

蛍光標識法の再検討

- ・ビオチンのウレイド環のケトンに標識可能か
- ・ビオチンのカルボン酸への標識について別試薬の検討

従来法との比較

HPLC 法を十分に確立させることができなかったため、HPLC 法の代用となる測定法について検討を行った。ビオチン測定法として、現在使用されている方法としては、微生物学的定量法である比濁法、寒天プレート法があ

り、免疫学的測定法として酵素免疫学測定法(免疫法)が開発されている。これらの方法で血清および尿のビオチン測定値を比較検討した(表1)(図4)。血清 45 サンプルおよび尿 87 サンプルについて分析を行った。また災害食およびビオチンサプリメントを摂取した後、血清および尿中ビオチン濃度を測定した。

表1 . 測定法の違いによる尿中ビオチン濃度の比較

	比濁法	寒天プレート法
N	32	32
MEAN	28.93	19.42
SD	17.81	11.77
MIN	1.1	1.3
MAX	61.6	47.5
R ²	0.762	

(ng/mL)

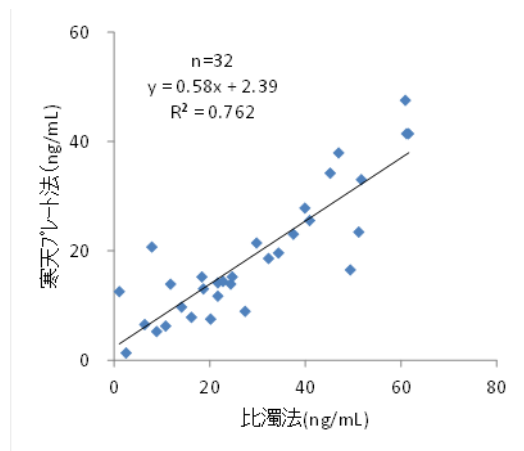


図4 . 比濁法と寒天プレート法による尿中ビオチンの比較

微生物学的定量法による尿中ビオチン量は、日常時の平均排泄量(32 サンプル)は $1.09 \pm 0.71 \text{ mol/mol Cre}$ であったが、負荷後の平均排泄量は $167 \pm 114 \text{ mol/mol Cre}$ (47 サンプル)であった。三者三様の測定値を示し、各々の相関性も低い。比濁法対寒天プレート法で血清総ビオチンと尿ビオチンにおいて高値のデータが大きく影響していたが、比較的相関性があった。しかしながら、これらの測定結果から標準法を提案するには至らなかった。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

渡邊敏明、田中楓子、榎原周平：ビオチン

欠乏妊娠マウスにおけるビオチンスルホキシドの効果についての検討．第 55 回日本先天異常学会学術集会、平成 27 年 7 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜会議センター（神奈川県・横浜市）．

榎原周平、澤村弘美、福井徹、渡邊敏明：ミツバチ産物中のビオチンとその類縁物質含量について．日本ビタミン学会第 67 回大会、平成 27 年 6 月 5 日-6 日、奈良県新公会堂（奈良春日野国際フォーラム 薨~I・RA・KA~）（奈良県・奈良市）．

Wanti Shen, Masahiro Yuasa, Hiromi Sawamura, Fumihito Nozaki, Toshiaki Watanabe: Biotin and carnitine contents of infant formulas manufactured in China. 12th Asian Congress of Nutrition, 14-18 May, 2015, Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama).

6．研究組織

(1)研究代表者

渡邊 敏明 (WATANABE, Toshiaki)
兵庫県立大学・環境人間学部・教授
研究者番号：3 0 0 9 1 8 4 6

(2)研究分担者

福井 徹 (FUKUI, Toru)
兵庫県立大学・環境人間学部・研究員
研究者番号：5 0 4 2 5 4 4 3

榎原 周平 (EBARA, Shuhei)
兵庫県立大学・環境人間学部・助教
研究者番号：1 0 3 7 2 8 5 6

澤村 弘美 (SAWAMURA, Hiromi)
兵庫県立大学・環境人間学部・助手
研究者番号：3 0 5 5 5 3 7 1