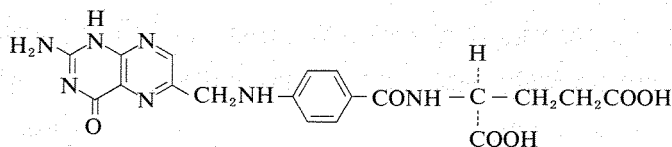


## 91 葉 酸

Folic Acid

 $C_{19}H_{19}N_7O_6 : 441.40$ 

## 1. 試験法の概要

食品中の葉酸は、*Lactobacillus casei* ATCC 7469 を用いる微生物定量法により定量する。食品中には、葉酸及びその関連化合物が分布している場合もある。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来の葉酸及びその関連化合物と添加されたものとの合計値である。

## 2. 試験法 (微生物定量法)

## (1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

## (2) 試料液の調製

葉酸として約  $1\mu\text{g}$  に対応する、通常、 $10\text{g}$  以下の試料の量<sup>1)</sup>を精密に量り、水約  $10\text{ml}$ 、アンモニア水の溶液 (2 → 5)  $2\text{ml}$  を加え、よくかき混ぜ、綿栓をほどこし、オートクレーブに入れ、 $121^\circ\text{C}$  で  $15$  分間加熱した後、冷却する。冷後、澄明な抽出液が得られるような方法<sup>2)</sup>でろ過又は遠心分離し、更に水  $70\sim 80\text{ml}$  を用いてろ液又は分離液を集め、塩酸 ( $0.1\sim 1\text{mol/l}$ ) 又は水酸化ナトリウム溶液 ( $0.1\sim 1\text{mol/l}$ ) で pH を  $6.8$  に調整<sup>3)</sup>した後、水を加えて正確に  $200\text{ml}$  とする。この液  $20\text{ml}$  を正確に量り、水を加えて正確に  $100\text{ml}$  とし、試料液とする。

## (3) 標準液の調製

葉酸  $0.010\text{g}$  を正確に量り、 $500\text{ml}$  のメスフラスコに入れ、 $0.01\text{mol/l}$  水酸化ナトリウム溶液約  $30\text{ml}$  を加えて溶かし、水約  $300\text{ml}$  を加え、更に塩酸 (1 → 120) を加えて pH を  $7\sim 8$  に調整した後、水を加えて正確に  $500\text{ml}$  とし、標準原液とする (この液  $1\text{ml}$  は、葉酸  $20\mu\text{g}$  を含

む)。この液はトルエン1滴を加え、遮光した冷所に保存する。標準原液5mlを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとし、更にこの液10mlを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとし、標準液とする（この液1mlは、葉酸1ngを含む）。

#### (4) 定量用培地の調製

ビタミン不含カザミノ酸2.5g、アスパラギン溶液15ml、トリプトファン溶液12.5ml、アデニン・グアニン・ウラシル溶液2.5ml、ビタミン液50ml、塩類溶液A5ml、塩類溶液B5ml、L-システイン塩酸塩一水和物0.125g、ブドウ糖10g、無水酢酸ナトリウム10g、キサンチン溶液5mlをそれぞれ300mlの三角フラスコに入れ、よく振り混ぜて溶かし、塩酸(0.1~1mol/l)又は水酸化ナトリウム溶液(0.1~1mol/l)を加えてpHを6.8に調整する。次に、ポリソルベート80・エタノール液0.25mlを加え、沸騰水浴中で5分間加熱した後、流水中で冷却し、グルタチオン溶液1mlを加え、よく振り混ぜた後、ろ過し、ろ液に水を加えて250mlとし、定量用培地とする。

#### (5) 接種菌液の調製

使用菌株として *Lactobacillus casei* ATCC 7469 を用いる。その保存された菌株保存用培地から増菌用培地に移植し、37℃で16~24時間培養する。この培養液5mlを採り、増殖した菌体を無菌的に遠心分離し、滅菌生理食塩水で3回洗う。接種菌液の濃度は、分光光度計を用い、滅菌生理食塩水を対照とし、波長550nmにおける透過率が75~85%になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

#### (6) 測定法

##### ① 菌の接種と培養

標準液0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4ml及び5mlを2回ずつ正確に量り、それぞれ2系列の試験管(20×150mm) S<sub>A</sub>(0~5), S<sub>B</sub>(0~5)に入れる。別に試料液の1.5, 2, 2.5, 3ml及び4mlを2回ずつ正確に量り、それぞれ別の2系列の試験管 T<sub>A</sub>(1.5~4), T<sub>B</sub>(1.5~4)に入れる。次にすべての試験管に水を加えて正確に5mlとする。更に別に対照液用として、2本の試験管に水5mlずつをそれぞれ正確に量って入れる。

これら全試験管に定量用培地5mlずつを正確に量って加え、全試験管をアルミ製キャップでふたをし、121℃で5分間高圧蒸気滅菌を行う。冷後、対照液用試験管を除き、他のすべての試験管に接種菌液を1滴ずつ無菌的に接種した後、対照液用試験管を含め、全試験管を37±0.5℃の温度で16~24時間培養する。培養後、直ちに全試験管同時に115℃で5分間高圧蒸気滅菌し、培養液とする。

## ② 測定

各試験管の培養液につき、分光光度計を用い、それぞれ液層 10mm、波長 550nm における透過率を、それぞれ対照液を対照として測定する。標準液によるものを  $S_a$  (0~5) 及び  $S_b$  (0~5) とし、試料液によるものを  $T_a$  (1.5~4) 及び  $T_b$  (1.5~4) とする。

③ 定量<sup>4)</sup>

それぞれ対応する標準液の透過率  $S_{a0}$  と  $S_{b0}$ ,  $S_{a0.5}$  と  $S_{b0.5}$ , ……  $S_{a5}$  と  $S_{b5}$  のそれぞれの平均値を求め、検量線を作成する。試料液の透過率  $T_a$  (1.5~4) 及び  $T_b$  (1.5~4) についてもそれぞれ同様に対応する平均値を求め、このそれぞれの平均値について検量線からそれぞれの試験管の中の葉酸濃度 (ng/ml) を求め、更に試料液 1ml 当たりの含量を求めて、これらの平均値を  $c$  (ng/ml) とし、次式によって検体中の葉酸含量 (g/kg) を計算する。ただし、標準液及び試料液の各吸光度がそれぞれの濃度系列の値の傾向からみて  $\pm 10\%$  以上かけはなれている場合はこの透過率はないものとみなす。また試料液の培養液 10 本中 6 本以上の透過率が無いものとみなされたときは試験をやり直す。

$$\text{葉酸の含量 (g/kg)} = \frac{c}{W \times 1,000}$$

$c$  : 試料液中の平均葉酸濃度 (ng/ml)

$W$  : 試料の採取量 (g)

## 試薬・試液

1. L-アスパラギン水和物：[特級]
2. アスパラギン溶液：L-アスパラギン水和物 8.0g に水 800ml を加えて溶かす。トルエン 1 滴を加えて保存する。
3. アデニン・グアニン・ウラシル溶液：硫酸アデニン、塩酸グアニン及びウラシルそれぞれ 0.500g に、塩酸 (1→2) 25ml を加え、水浴中で加熱して溶かす。冷後、水を加えて全量を 500ml とする。トルエン 1 滴を加えて冷所に保存する。
4. アンモニア水：[25~28%，特級]
5. ウラシル：市販の特級品を用いる。
6. エタノール：[95v/v%特級]
7. 塩酸グアニン：市販の特級品を用いる。
8. 塩酸チアミン：市販の特級品を用いる。
9. 塩酸ピリドキシン：市販の特級品を用いる。
10. 塩類溶液 A：リン酸一カリウム 25g 及びリン酸二カリウム 25g に水を加えて溶かして 500ml とする。塩酸 5 滴及びトルエン 1 滴を加えて保存する。
11. 塩類溶液 B：硫酸マグネシウム 20g、塩化ナトリウム 1.0g、硫酸第一鉄 1.0g 及び硫酸マ

ンガン 1.0g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。塩酸 10 滴及びトルエン 2 滴を加えて保存する。

12. 寒天末：市販品を用いる。
  13. キサンチン：[1 級]
  14. キサンチン溶液：キサンチン 0.400g に水約 80ml 加え、振り混ぜながら水浴中で 70～80℃に加熱し、アンモニア水の溶液（2→5）12ml を加え、振り混ぜて溶かす。冷後、水を加えて 400ml とし、トルエン 1 滴を加えて冷所に保存する。
  15. 菌株保存用培地及び保存方法：ペプトナイズドミルク 15g, 酵母エキス粉末 10g, ブドウ糖 10g, リン酸一カリウム 2g に約 600ml の水を加えて溶かし、これにトマトジュースのろ液 100ml を加え、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 6.5～6.8 に調整した後、ポリソルベート 80・エタノール液 10ml を加え、水を加えて 1,000ml とする。この液に寒天末 10～15g を加え、加熱して溶かし、温時 10ml ずつ、あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌を行った試験管に分注し、121℃で 20 分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後、直ちに冷却し、固化させる<sup>5)</sup>。
- Lactobacillus casei* ATCC 7469 の純粋培養から菌株保存用培地に移植する。移植された菌株保存用培地は、37℃で 16～24 時間培養し、冷所に保存する<sup>6)</sup>。
16. グルタチオン溶液：グルタチオン（還元型）0.125g に水 100ml を加えて溶かす。凍結して保存する。
  17. グルタチオン（還元型）：[特級]
  18. 酵母エキス粉末：市販品を用いる。
  19. L-システイン塩酸塩一水和物：[特級]
  20. 増菌用培地：菌株保存用培地と同一組成で、寒天末を加えない培地を調製し、あらかじめ綿栓をし、乾熱滅菌（170℃, 2 時間）を行った試験管に 10ml ずつ分注し、121℃で 10 分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後、直ちに冷却し、冷所に保存する。
  21. L-トリプトファン：[特級]
  22. トリプトファン溶液：L-トリプトファン 2g に水 700～800ml を加えて懸濁する。70～80℃に加熱し、振り混ぜながら塩酸を L-トリプトファンの結晶が溶けるまで滴加する。冷後、水を加えて 1,000ml とする。トルエン 1 滴を加えて常温で保存する。
  23. トルエン：[特級]
  24. ニコチン酸：市販の特級品を用いる。
  25. パラアミノ安息香酸：[特級]
  26. パントテン酸カルシウム：市販の 1 級品を用いる。
  27. D-ビオチン：市販品を用いる。
  28. ビタミン液：パラアミノ安息香酸 20.0mg, 塩酸ピリドキシン 40.0mg, 塩酸チアミン

4.0mg, パントテン酸カルシウム 8.0mg, ニコチン酸 8.0mg 及びD-ビオチン溶液 (1 → 100,000) 20ml を約 300ml の水に溶かし, これにリボフラビン 10.0mg に酢酸 (3 → 2,500) 200ml を加えて溶かした液を加える. 次に無水酢酸ナトリウム 1.9g 及び酢酸 1.6ml に水を加えて 40ml とした液を加え, 更に水を加えて 2,000ml とする. トルエン 1 滴を加え, 遮光して冷所に保存する.

29. ビタミン不含カザミノ酸：市販品を用いる.
30. ブドウ糖：[特級]
31. ペプトナイズドミルク：市販品を用いる.
32. ポリソルベート 80：市販品を用いる.
33. ポリソルベート 80・エタノール液：ポリソルベート 80 25g にエタノールを加えて溶かして 250ml とする.
34. 無水酢酸ナトリウム：酢酸ナトリウム (無水) [特級]
35. 滅菌生理食塩水：塩化ナトリウム 9g に水 1,000ml を加えて溶かし, あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌を行った試験管に約 10ml ずつ分注し, 121°C で 20 分間高压蒸気滅菌を行う.
36. リボフラビン：市販の 1 級品を用いる.
37. 硫酸アデニン：市販の特級品を用いる.
38. 硫酸第一鉄：[特級]
39. 硫酸マグネシウム：[特級]
40. 硫酸マンガン：[特級]
41. リン酸一カリウム：[特級]
42. リン酸二カリウム：[特級]

[注]

- 1) 調製粉乳のように試料の量が少なく水に溶ける場合は 10 倍量 (葉酸として 10 $\mu$ g に対応する量) を採取して水に溶かし, 2) の操作後, 正確に 100ml とし, その 10ml を正確に量って試料液の調製に用いてもよい.
- 2) 本法は, 菌の増殖度を濁度により測定するので, 試料液は完全に澄明でなければならない. 調製粉乳のように, カゼインを含むものにあつては, 薄めた塩酸で pH を約 4.5 に調整してカゼインを沈殿させた後, ろ過又は遠心分離して沈殿を除くと澄明な液が得られる.
- 3) 塩酸, 水酸化ナトリウム溶液等のように, 測定液の調製に際して微生物の生育に妨げとならない種類の酸, アルカリを用いて調製する.
- 4) 標準液の場合の透過率の平均値は, 75% を超えることが望ましい.
- 5) 培地の上面に凝固水がたまることがあるが, この場合は, ふ卵器 (37°C) に入れて一夜放置し, 凝固水を蒸発された後用いる. 遮光して冷所に保存し, 調製後 1 カ月以内に用いる.
- 6) 保存菌株は毎週新たに調製し, 1 週間を超えたものは, 接種菌液の調製に使用してはならない.