

．水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

3．ビタミン B₆の定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したビタミン B₆ 関連化合物の測定方法をまとめた．

A. 実験方法

1．HPLC による尿中 4-ピリドキシン酸測定方法

1-1．試薬作成方法

5 mM KPB, (pH 7.5) (冷蔵保存)

1) $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.09$ (和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$136.09 \times 1 \times 0.05 = 6.8045$$

KH_2PO_4 を 6.805 g 秤量し、水を加え 50 ml にした．

2) $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 174.18$ (和光純薬工業株式会社、室温保存)

$$174.18 \times 1 \times 0.05 = 8.709$$

KH_2PO_4 を 8.701 g 秤量し、水を加え 50 ml にした．

3) ビーカーに 2) を 40 ml 程度入れて、スターラーで攪拌しながら 1) を加え、pH メーターで pH 7.5 になるように合わせた。(1 M KPB)

4) 3) を 5 ml とり、超純水 995 ml を加え 200 倍希釈した．

4-PIC 標準 (冷蔵保存)

4-Pyridoxic acid (4-PIC) = 183.2

(SIGMA, 冷凍保存)

1) 1 mg/ml の 4-PIC を作成．4-PIC を 0.01 g 秤量し 5 mM KPB 溶液 10 ml に溶解した．

2) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4-PIC 作成 .1) を 0.01 ml 取り、5 mM KPB 溶液を 9.99 ml 加えて 100 倍希釈した．

3) 2) の吸光度を測定し $\epsilon_{316 \text{ nm}} = 5970$ より正確な濃度を求めた．

4) 1.0 μl 4-PIC を作成．2) を 0.1 ml 取り、5 mM KPB 溶液を 9.9 ml 加えて 10 倍希釈し、これを標準液とした．

標準のスペクトルを図 1 に示した．

50% KOH (冷蔵保存)

Potassium Hydroxide=56.11 (和光純薬工業株

式会社、室温保存)

1) KOH を 500 g 秤量して、800 ml 程の超純水で溶解させた。(このとき熱を発するのでドラフト内で氷冷しながら行った.)

2) メスシリンダーに移し、超純水にて 1L 定容．

1-2．試料調製方法

図 2 に示した．

1-3．測定条件

移動相：500 ml の超純水に 85%リン酸(市販品)を 2.3 ml 添加し、50%KOH で pH 2.2 に調製．この緩衝液を 900 ml に定容した後、100 ml のメタノールを加える．

流速： 1.0 ml / min

PRESSURE： 90 kgf / cm²

カラム： TOSOH TSKgel ODS-120A(ϕ 4.6mm \times 250 mm)

カラム温度： 30

試料注入量： 20 μl

検出器： SHIMADZU RF-10A

検出方法： 蛍光法 (励起波長 355 nm, 蛍光波長 436 nm)

1-4．計算方法

1) 4-PIC 標準液 (5.46×10^{-6} M, 20 μl) を流し、1 pmol あたりの AREA を計算した (約 10000 / pmol) (図 3)

2) 検出 AREA / 1 pmol あたりの AREA \times 24 時間尿の全量 (ml) / 0.02 ml $\times 10^{-3}$
= ___ nmol / day (図 4) .

2．微生物定量法による食品中ビタミン B₆ の測定方法

2-1. 試薬作成方法

0.055 M HCl (室温保存)

Hydrochloric Acid=36

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

12 / 0.055=218.18

HCl (12 M) 1 ml に超純水を 217.2 ml 加えた。

1 M NaOH (冷蔵保存)

Sodium Hydroxide = 40

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

40×1×0.5 = 20

1) NaOH を 20g 秤量して, 250 ml 程の超純水で溶解させた。(このとき刺激臭と熱を発生するのでドラフト内で氷冷しながら行った。)

2) メスシリンダーに移し, 超純水にて 500ml にメスアップした。

ピリドキシン塩酸塩標準液 (凍結保存)

Pyridoxine Hydrochlorido Standard=205.64

(和光純薬株式会社, 冷蔵保存)

1) エタノール(和光純薬工業株式会社, 室温保存) 25 ml に超純水 75 ml を加え, 25 % (V/V)エタノール溶液を作成する。

2) PN-HCl を 0.0035 g 秤量し, 25 % (v/v)エタノール溶液を 14.35 ml 加えて溶かす。(計算上は 200 µg / ml PN 溶液となるが, エタノールを正確にはかりとるのが難しいため, 誤差が生じることが多い)

3) 分光光度計を以て吸光度を測定し, 325 nm=7100 より正確な濃度を計算する。濃い場合は超純水で適宜希釈し, 測定する(凍結保存可)

4) 3)で作成した溶液 1 ml 中に PN が 5 ng を含むように, 用事, 超純水で希釈して調製する。(使用直前に調整すること)

使用する試薬は PN-HCl (m.w=205.64)であるが, 計算するときは PN (m.w=169.18)の分子量で計算するので注意する。

標準液のスペクトルを図 5 に示した。

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 °C, 5min)し冷却後, 冷蔵保存する。

保存用培地, 斜面培地

培地の組成を表 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 °C, 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)。

ビタミン B₆ 定量用培地

ビタミン B₆ 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 13.0g を秤量し, 水を加え, 沸騰水浴中で完全溶解後, 100ml 定容。

2-2. 試料作成方法

図 6 に食品中のビタミン B₆ を遊離させる方法を示した。

2-3. 定量操作方法

接種用菌作成方法

- 1) *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 (住商ファーマインターナショナル株式会社, 凍結保存)の植えてある保存用平面培地(保存培地への植え継ぎは 2 週間に 1 回行う。植え継いだときは 37 °C で 20 時間培養した後, 冷蔵庫で保存する。)から菌体を 1 白金耳取り, 斜面培地に塗布する。これを 37 °C で 20 時間培養する。
- 2) 24 時間培養した斜面培地から菌体を 1 白金耳取り, 新しい斜面培地に塗布する。
- 3) この保存菌株から 1 白金耳をとり, 660 nm における透過率が 60~90%になるように滅菌生理食塩水で希釈し, 接種用菌株とし, 30 µl ずつ定量用試験管に分注する。

定量操作

表 3 に示した溶液をビタミン B₆ 定量用試験管に分注する。検量線用, 試料ともに 3 連で行うが, Tube Number. 0 については, 1 本には菌を接種しないこと(雑菌の繁殖がないことをたしかめるため)。

分注した試験管にアルミキャップをし, オートクレーブ(121 °C, プラス 1 気圧, 10 min)にかけ, 大気圧に戻ったら直に取り出し氷冷する。

接種用菌を滅菌したピペットマンで 30 μ l ずつ分注する。

30 で 20 時間振とう培養する。

分光光度計を 600 nm の波長にあわせ ,Tube Number. 0 の欠菌試験管で 0 あわせを行う。(本実験は分光光度計の都合上,660 nm で測定した。)

Tube Number. 0 (菌を接種)の吸光度が 0 であることを確認後,全ての試験管の吸光度を測定する。なお,測定する際には懸濁液をタッチミキサーで均一化後,測定すること。

ピリドキシン標準を含む培養液の測定値から検量線を作成し,これにより試料液のピリドキシン量を求める。

検量線の一例を図 7 に示した。

2-4. 計算方法

ビタミン B₆ 含量 (mg/100 g) = { (A×N×V) / (W×1000000) } × 100

A : 検量線より求めた試験溶液中のビタミン B₆ 濃度 (ng/ml)

N : 定容量 (ml)

V : 希釈倍数

W : 試料採取量 (g)

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

4-PIC吸光度測定例

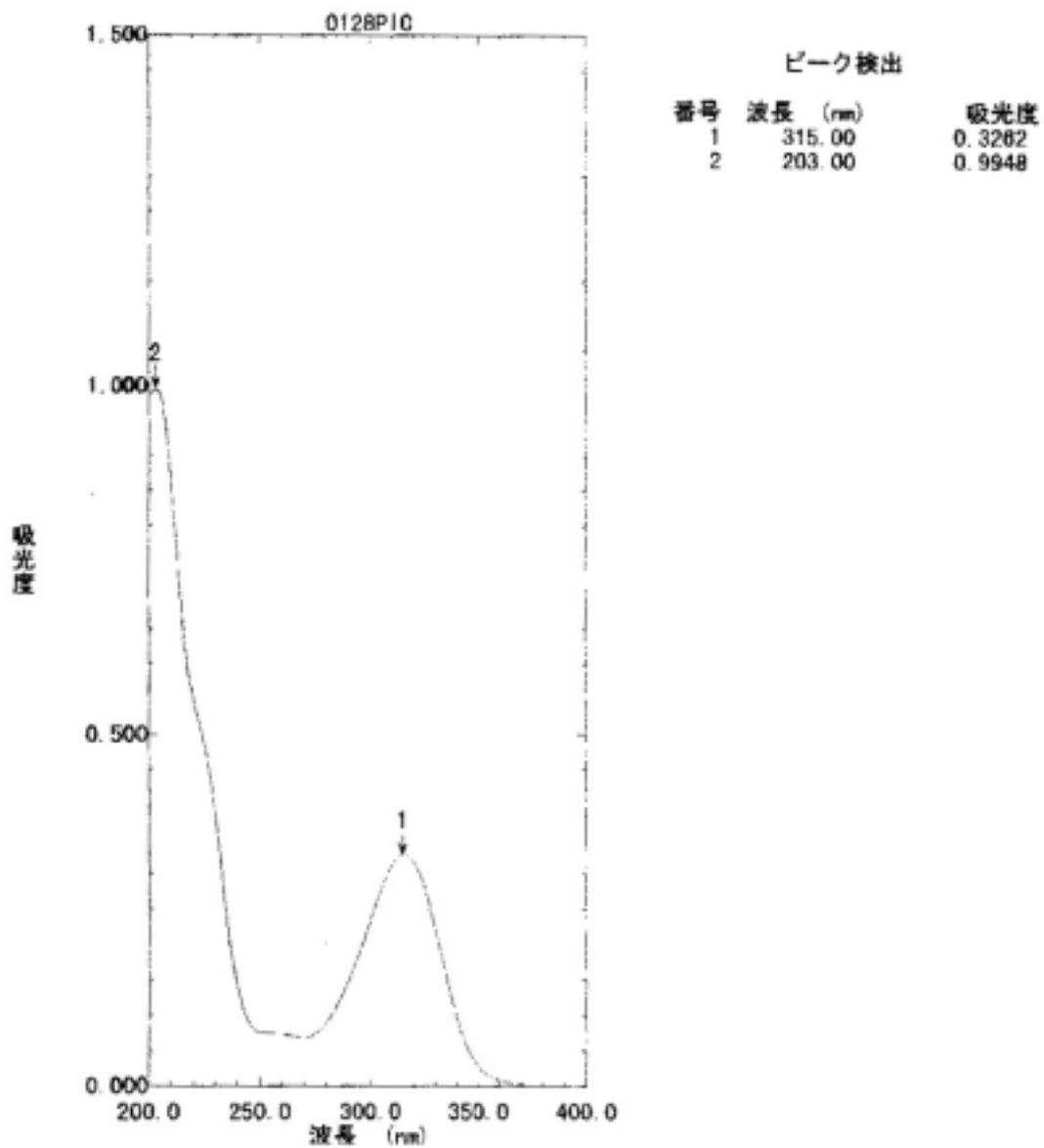


図1 . 4-ピリドキシンのUV スペクトラム

尿

↓ 遠心分離 2000 rpm, 5 min (卓上多本架遠心機 LC-122)

↓ 0.45 μ m のフィルターでろ過

HPLC 注入用試料

図 2 ビタミン B₆ 代謝産物 4-ピリドキシン酸測定のための HPLC 用試料の調製方法

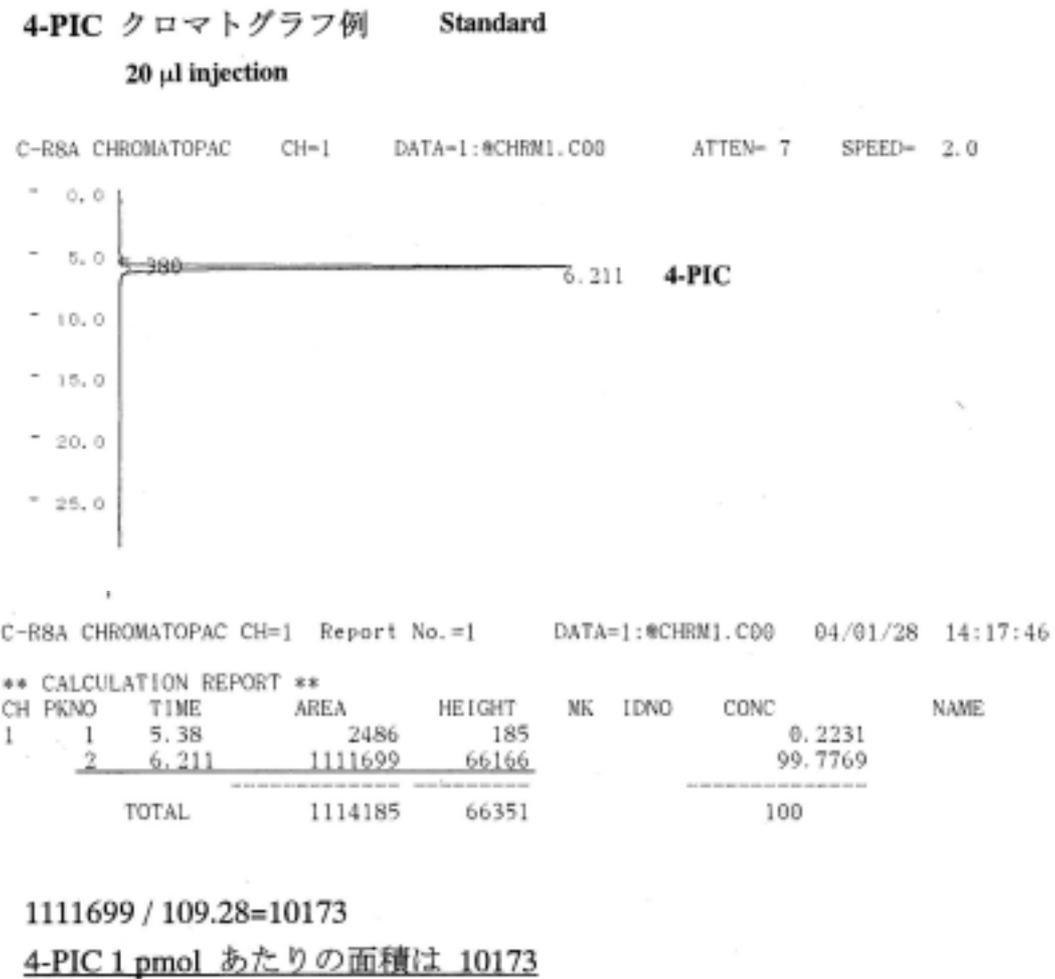
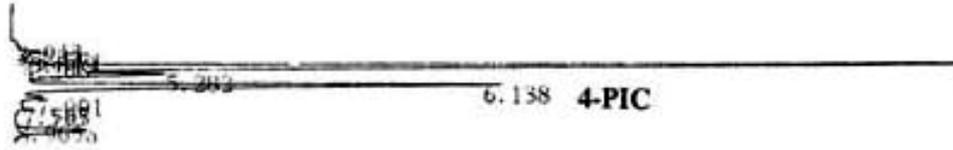


図 3 . 標準の 4-ピリドキシン酸の HPLC クロマトグラム例



C-HSA CHROMATO PAC CH-1 Report No. -4 DATA 1: #CHRM1.C03 03/12/24 15:15:14

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC
1	1	2.943	10648	716			0.1343
	3	3.571	54388	3615	V		0.686
	4	3.849	35589	2037	V		0.4489
	6	4.714	2292951	148141	V		28.9211
	7	5.282	339284	19414	V		4.2794
	8	6.138	1108082	64622	V		13.9763
	9	7.801	36509	2505			0.4605
		TOTAL	7928286	355911			100

図4 . 尿を試料としたときの HPLC クロマトグラム の例

PN-HCl 標準 吸光度測定例

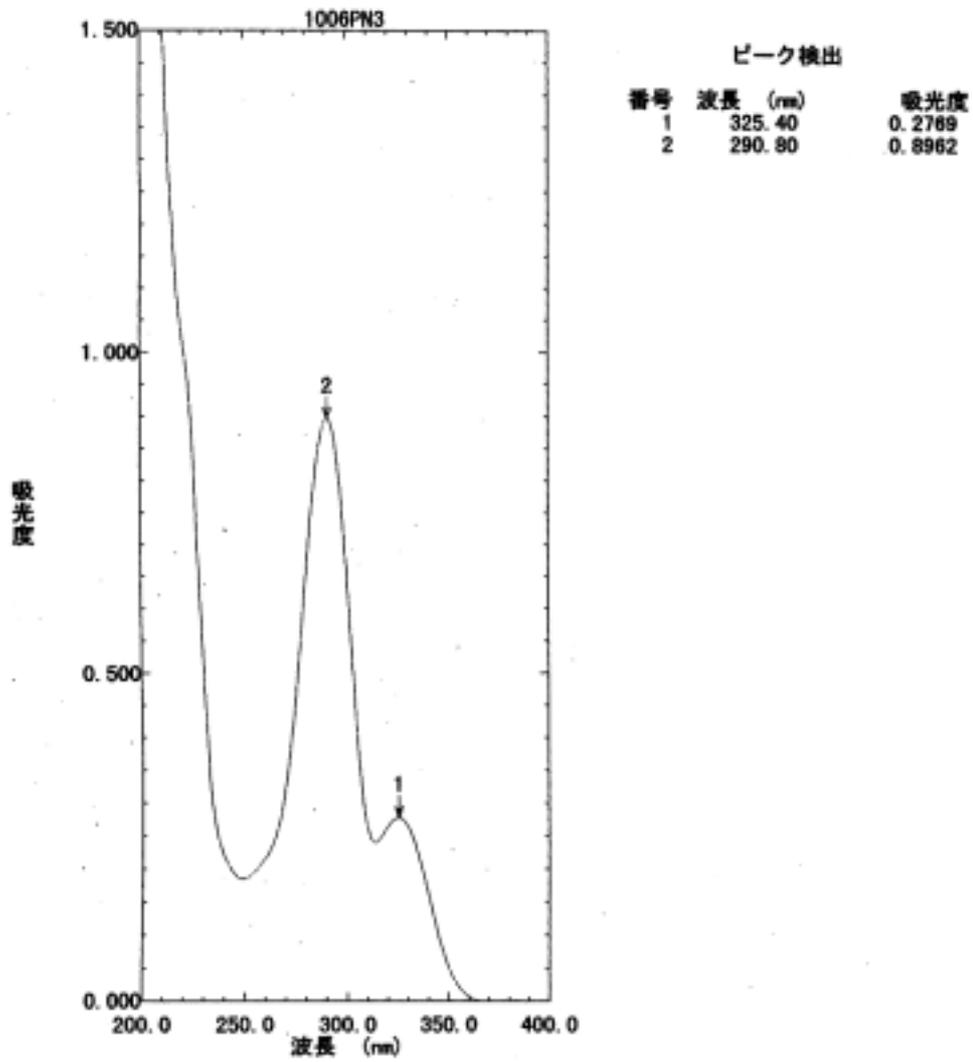


図5 . ピリドキシンのUVスペクトラム

食品採取（三角フラスコ，2～3g）

0.055M HCl 180ml を加える

抽出

オートクレーブ（121℃，3時間，プラス1気圧）

十分に冷却

1M NaOH にて pH 5.0 に調整（約 9.5ml 加えると良い）

超純水で定容（250ml）

ろ過（定性濾紙 No.2（ADVANTEC 株式会社）を用いる。）

試験溶液（凍結保存可）

図6．食品中のビタミン B₆ 測定用の試料調製方法

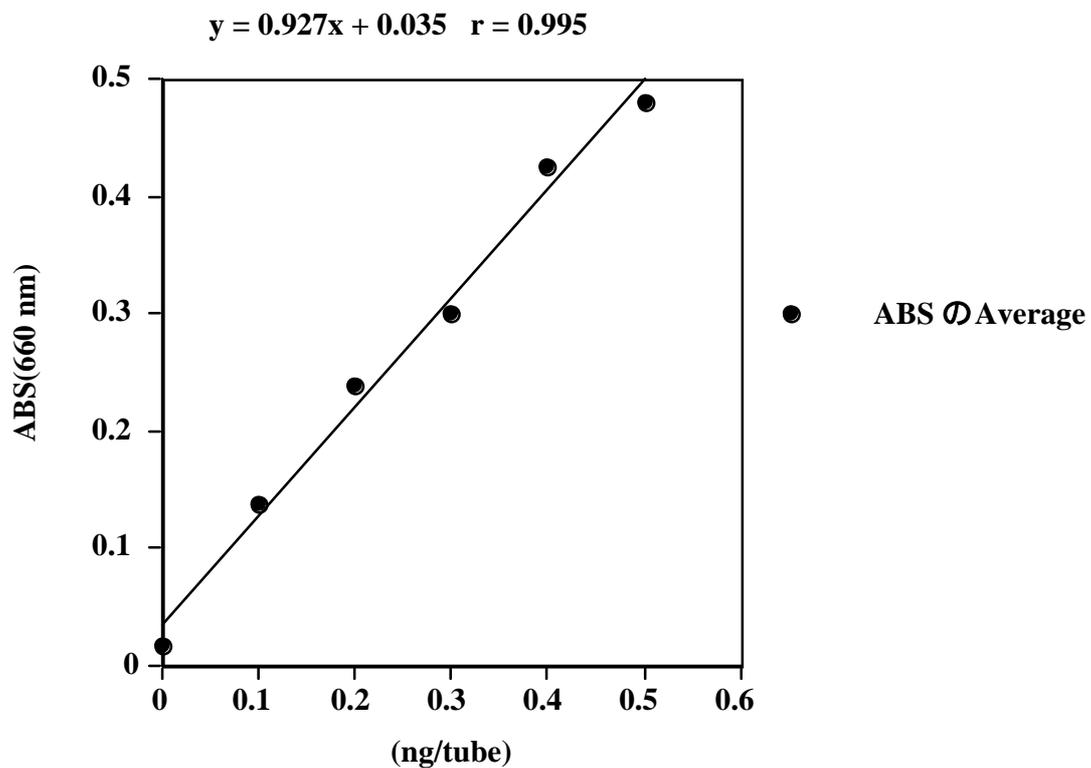


図7．ビタミン B₆ 測定の検量線の一例

表 1 . *Saccharomyces carlsbergensis* strain 4228 ATCC 9080 保存培地組成

組成	g
酵母エキス粉末 (和光純薬株式会社、室温保存)	0.3
麦芽エキス粉末 (和光純薬株式会社、室温保存)	0.3
ペプトン (和光純薬株式会社、室温保存)	0.5
スクロース (和光純薬株式会社、室温保存)	1.0
寒天 (和光純薬株式会社、室温保存)	2.0
超純水	95.9

表 2 . ビタミン B6 定量用培地

カザミノ酸	0.8 g	塩化カルシウム	25 mg
イノシトール	5.0mg	硫酸マグネシウム	25 mg
塩酸チアミン	50 µg	硫酸マンガン	500 µg
ニコチン酸	500µg	リン酸二水素カリウム	110mg
パントテン酸カルシウム	500µg	塩化第二鉄	500µg
ビオチン	1.6 µg	クエン酸カリウム	1.0 g
塩化カリウム	85 mg	クエン酸	0.2 g
ブドウ糖	10 g		
		pH5.2± 0.1	

表3. ビタミン B₆の定量操作方法

試験管 No.	PN 量 (ng / tube)	基礎培地 (ml)	PN 標準液 (ml)	超純水 (ml)	Total (ml)
0	0	1.0	0	1.0	2.0
1	0.1	↓	0.04	0.96	↓
2	0.2		0.08	0.92	
3	0.3		0.12	0.88	
4	0.4		0.16	0.82	
5	0.5		0.20	0.80	
6	0.6		0.24	0.76	
7	1.0		0.40	0.60	
Sample	x	↓	試料	(1.0-試料量)	↓