

II. 水溶性ビタミン関連物質の定量方法

5. ナイアシンの定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したナイアシン関連化合物の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1. HPLC による尿中ニコチンアミド

(Nicotinamide: Nam), 尿中 2-Py (*N*¹-methyl-2-pyridone-5-carboxamide), 尿中 4-Py (*N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide) 測定方法

1-1. 試薬作成方法

イソニコチンアミド標準 (凍結保存)

Pyridine-4-carboxamide = 122.13

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

1) 1 mg / ml イソニコチンアミドを作成.

イソニコチンアミドを 0.001 g 秤量し, 超純水を 1.0 ml 加えた.

2) 1)を 0.1 ml 取り, 超純水を 4.9 ml 加え, 50 倍希釈し, この液を標準として 20 μ l インジェクションした.

ニコチンアミド標準 (凍結保存)

Nicotinamide = 122.13 (和光純薬工業株式会社, 室温保存)

1) 1 mg / ml のニコチンアミドを作成.

ニコチンアミドを 0.002 g 秤量し, 50 mM KPB, pH 7.0 を 2.0 ml 加えた.

2) 1)を 0.2 ml 取り, 50 mM KPB pH 7.0 を 3.8 ml 加えて, 20 倍希釈した.

3) 2)の吸光度を測定し, ϵ 265nm= 3300 より正確な濃度を求め (対照セルには 50 mM KPB, pH 7.0 を入れること), この液を標準とし, 20 μ l インジェクションした.

($0.4950 / 3300 = 1.50 \times 10^{-4}$ M)

標準のスペクトルを図 1 に示した.

2-Py 標準 (凍結保存)

*N*¹-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide=167.12

(市販品なし. 自己合成品, 凍結保存)

1) 1 mg / ml の 2-Py を作成.

2-Py を 0.0027 g 秤量し, 超純水を 2.7 ml 加えた.

2) 1)を 0.05 ml 取り, 超純水を 4.95 ml 加えて, 100 倍希釈した.

3) 2)の吸光度を測定し, ϵ 250nm=14516 より

正確な濃度を求め, この液を標準とし, 20 μ l インジェクションした.

($0.5294 / 14516 = 3.65 \times 10^{-5}$ M)

標準のスペクトルを図 2 に示した.

4-Py 標準 (凍結保存)

*N*¹-Methyl-4-pyridone-3-carboxamide= 167.12

(市販品なし. 自己合成品, 凍結保存)

1) 1 mg / ml の 4-Py を作成.

4-Py を 0.0027 g 秤量し, 超純水を 2.7 ml 加えた.

2) 1)を 0.05 ml 取り, 超純水を 4.95 ml 加えて, 100 倍希釈した.

3) 2)の吸光度を測定 (図 3) し, ϵ 250 nm = 14516 より正確な濃度を求め, この液を標準とし, 20 μ l インジェクションした.

50mM KPB, pH 7.0

1) 50 mM KH₂PO₄

リン酸二水素カリウム= 136.09

リン酸二水素カリウム 0.34 g を秤量し, 超純水で溶解し, 水にて 50 ml にした.

2) 50mM K₂HPO₄

リン酸二水素カリウム= 174.18

リン酸水素二カリウム 0.87 g を秤量し, 超純水で溶解し, 水にて 100 ml にした.

3) スターラーで攪拌しながら, 1)に 2)を入れ, pH 7.0 にあわせた.

1M KH₂PO₄ (pH 3.0)

リン酸二水素カリウム= 136.09

リン酸二水素カリウム 136.09 g を秤量し, 水を 800 ml 程度加え, 完全に溶解させる. pH メーターを利用して, リン酸を滴下して, pH を 3.0 に調整した. その後, 水で 1000 ml にした.

1-2. 試料調製方法

尿を用いた時の HPLC 注入試料の作成方法を図 4 に示した.

1-3. 測定条件

移動相：1MKH ₂ PO ₄ (pH3.0)	10 ml
超蒸留水	990 ml
アセトニトリル	41.7 ml

流速：1.0 ml / min

PRESSURE：160 kgf / cm²

カラム：CHEMCOSORB 7-ODS-L (φ4.6×250 mm)

カラム温度：40℃

検出器：SHIMADZU SPD-10AVP

データプロセッサ：SHIMADZU CR-8A

検出方法：紫外分光光度計 (260 nm)

1-4. 計算方法

1) 標準混合液を流し、1 nmol あたりの面積を計算した (図 5).

2) 回収率を計算した.

回収率 (%) =

試料のイソニコチンアミド検出 AREA / イソニコチンアミド標準 (20μl / ml) の 20μl 検出 AREA

3) 検出 AREA / 1 nmol あたりの AREA×500 μl / 20 μl×1 日の尿量 (ml) / 1 ml×100 / 回収率 (%) = ____ nmol / day (図 6)

※500=全量, 20=注入量, 1=使用した尿量

(例) ラット尿

Nam : 35225 / 85763×500 / 20×25 / 1×100 / 91 = 282 nmol / day

2-Py : 439691 / 302119×500 / 20×25 / 1×100 / 91 = 1000 nmol / day

4-Py : 1745755 / 268886×500 / 20×25 / 1×100 / 91 = 4459 nmol / day

2. HPLC による尿中メチルニコチンアミド (N¹-methylnicotinamide: MNA) 測定方法

2-1. 試薬作成方法

MNA 標準 (冷蔵保存)

N¹-methylnicotinamide = 172.61 (東京化成工業株式会社, 室温保存)

1) 1 mg / ml の MNA-Cl を作成.

MNA-Cl を 0.0022 g 秤量し, 超純水を 2.2 ml 加え, 溶解した.

2) 1) を 0.1 ml 取り, 超純水を 4.9 ml 加え, 50 倍希釈した.

3) 2) の吸光度を測定 (図 7) し, ε 264.6 nm = 4940 より正確な濃度を求めた.
(0.5633 / 4940 = 1.140×10⁻⁴ M).

1 M Isonicotinamide (冷蔵保存)

Pyridine-4-carboxamide = 122.1

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

イソニコチンアミドを 1.22 g 秤量し, 超純水

にて 10 ml にした.

100 mM アセトフェノン in エタノール (冷蔵保存)

Acetophenone = 120.15

アセトフェノンを約 2.3 ml 取り, エタノールにて 200 ml にした.

6 M NaOH (冷蔵保存)

Sodium hydroxide = 40

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

NaOH を 120 g 秤量して, 250 ml 程の超純水で溶かした. (このとき刺激臭と熱を発するので, ドラフト内で氷で冷やしながら行った.) 溶けたらメスシリンダーに移し, 超純水にて 500 ml にした.

1 M KH₂PO₄ (pH 3.0)

リン酸二水素カリウム = 136.09

リン酸二水素カリウム 136.09 g を秤量し, 水を 800 ml 程度加え, 完全に溶解させる. pH メーターを利用して, リン酸を滴下して, pH を 3.0 に調整した. その後, 水で 1000 ml にした.

100 mM EDTA-2Na (冷蔵保存)

EDTA 2Na = 372.24

(和光純薬株式会社, 室温保存)

EDTA-2Na を 0.372 g 秤量し, 10 ml の超純水に溶かした.

2-2. 試料調整方法

尿を用いた時の MNA 測定のための HPLC 注入用試料の作成方法を図 8 に示した.

2-3. 測定条件

移動相：1 M KH ₂ PO ₄ (pH3.0)	30 ml
1-Heptanesulfonic acid sodium salt	1 g
100 mM EDTA-2Na	1 ml
超蒸留水	969 ml
アセトニトリル	290 ml

流速：1.0 ml / min

PRESSURE：140 kgf / cm²

カラム：Tosoh ODS-80Ts (φ4.6×250 mm)

カラム温度：40℃

検出器：SHIMADZU RF-10AXF

データプロセッサ：SHIMADZU CR-6A

検出方法：蛍光法 (励起波長 382 nm, 蛍光波長 440 nm)

2-4. 計算方法

1) 1.140×10⁻⁴ M の MNA を 20 μl (15.2 pmol) を使用して図 8 の操作を行った反応液を 20 μl HPLC に注入し, 1 pmol あたりの面積を出す.

$510564 / 15.2 = 33590 \text{ / pmol}$
 AREA / 1 pmolあたりの面積×3000 / 20×1日の
 尿量 / 0.1×1 / 1000 = _____nmol / day
 ※3000=全量, 20=インジェクションした量,
 0.1=使用した量
 (例) ラット尿
 $757722 / 33590 \times 3000 / 20 \times 25 / 0.1 \times 1 / 1000 =$
 846 nmol / day

3. HPLCによる肝臓および筋肉中ニコチンアミド測定方法

1-1. 試薬作成方法

尿中ニコチンアミドの測定で用いた試薬と同様

1-2. 試料調製方法

生体試料を用いた時のHPLC注入用試料の作成方法を図11に示した.

1-3. 測定条件

移動相: 1 M KH ₂ PO ₄ (pH 3.0)	10ml
Ultra-pure water	990ml
Acetonitrile	41.7ml

流速: 1.0 ml / min

PRESSURE: 160kgf / cm²

カラム: CHEMCOSORB 7-ODS-L (φ4.6×250 mm)

カラム温度: 40 °C

検出器: SHIMADZU LC-10AXL

検出方法: 紫外分光光度計 (260 nm)

1-4. 計算方法

1) Nam 標準を流し, 1 nmol あたりの面積を計算した.

2) IsoNam 標準(A)を流し(約 370000 / 20 μl), 回収率を求めた.

回収率 100 %の値 (B) =

$\text{AREA} \times 5 \times (3000 / 20) \times (1.0 / 3.2) \times (1.2 / 9.8) \times (1.0 / 1.26) \times (20 / 500)$

回収率(%) = (C / B) × 100

3) 試料中のニコチンアミド含量 (nmol / g of liver or tissue) =

1)で求めた値×(500 / 20)×(1.26 / 1.0)×(9.8 / 1.2)×(3.2 / 1.0)×(1.0 / 0.6) (図12).

4) 計算した値を回収率で割った値を真の値とした.

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

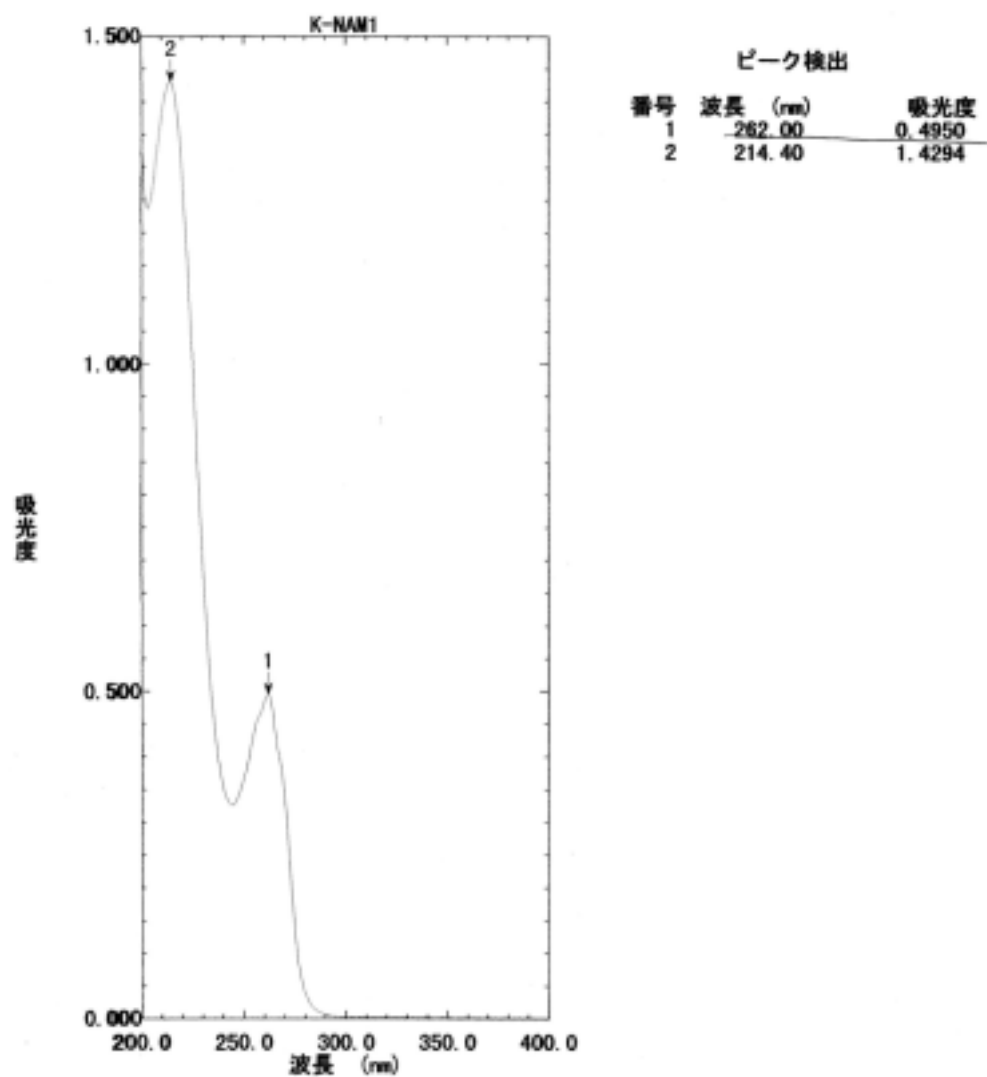


図 1. ニコチンアミドの UV スペクトラム

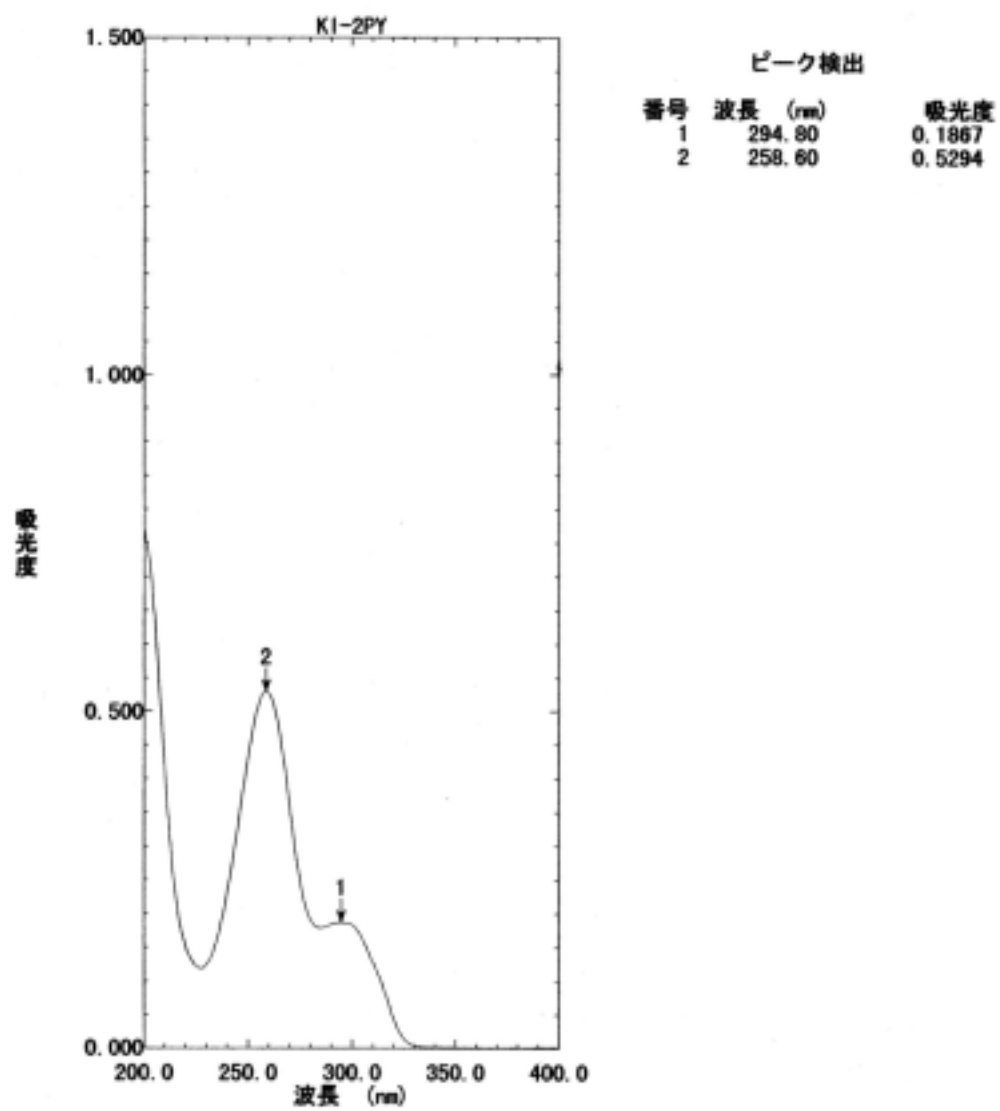


図 2.2-Py の UV スペクトラム

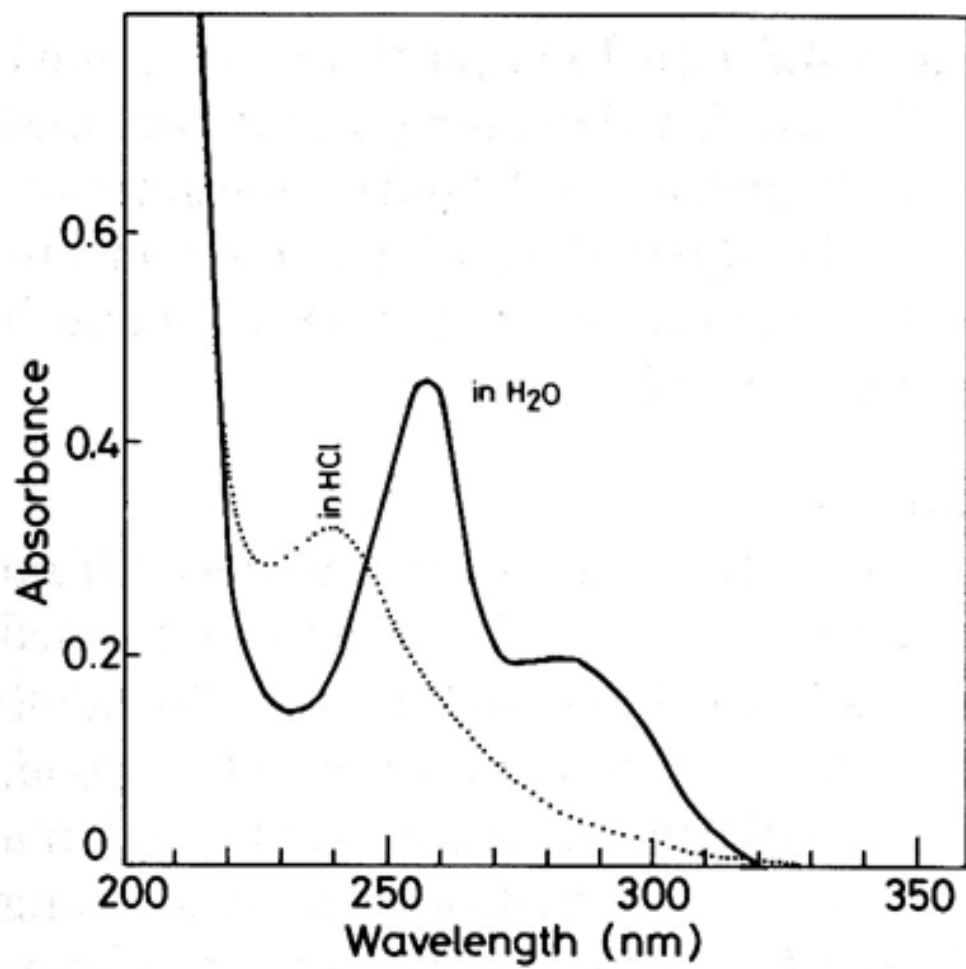


図 3. 4-Py の UV スペクトラム

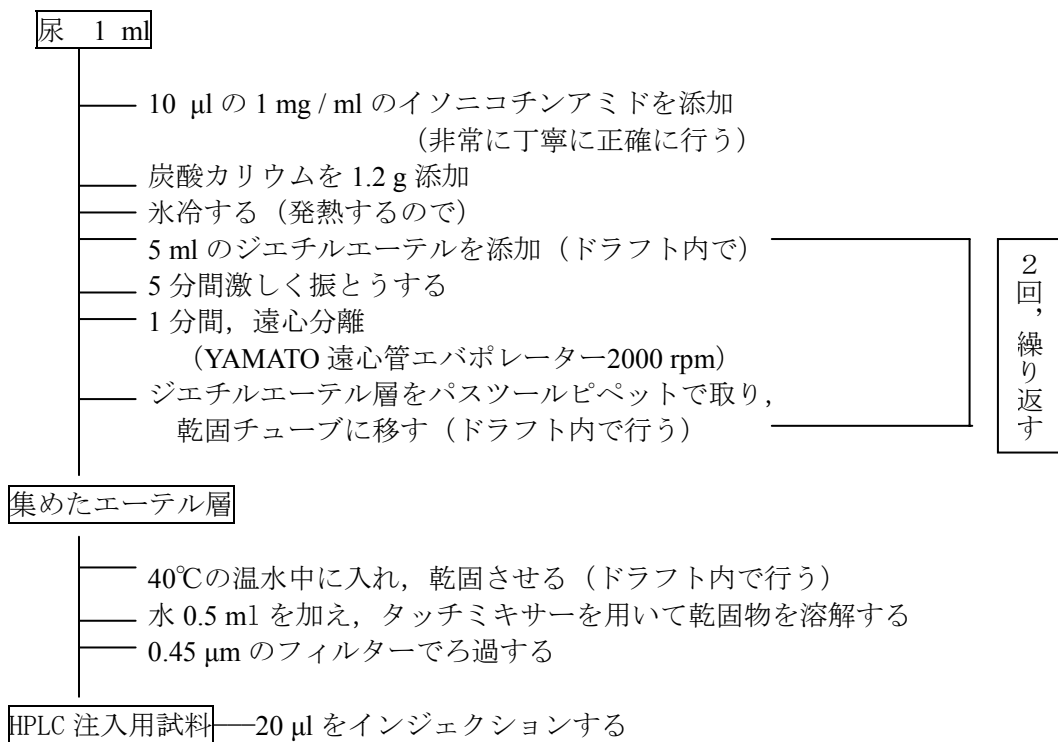


図 4. 尿を用いた時の HPLC 用試料の作成方法

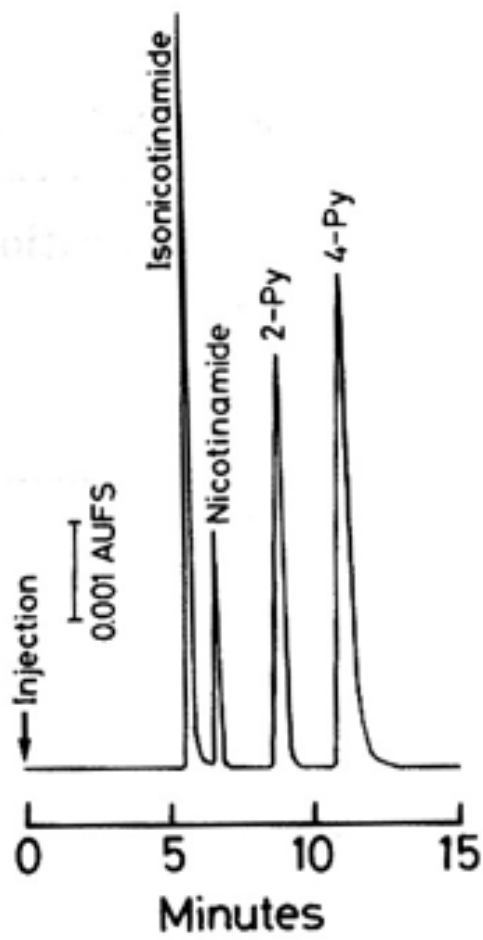
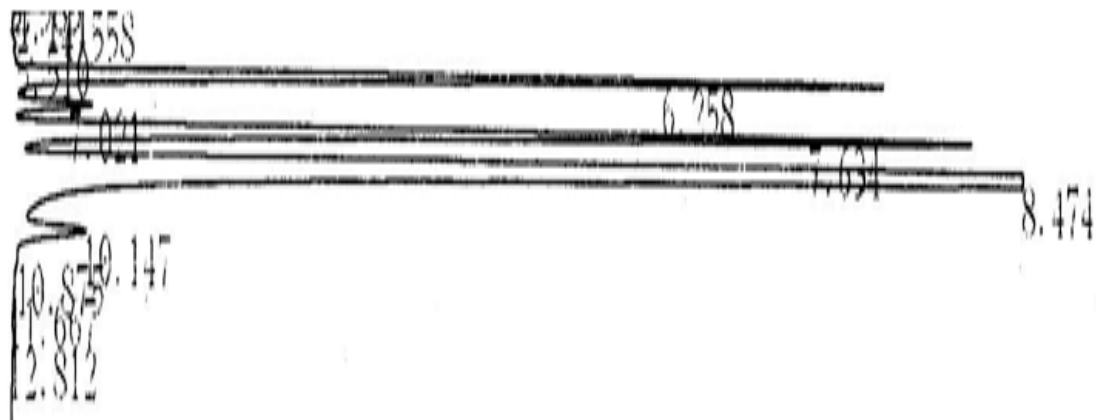


図 5. イソニコチンアミド、ニコチンアミド、2-Py、4-Py の各標準混合液の HPLC クロマトグラムの例



C-R8A CHROMATOPAC CH=1 Report No.=4 DATA=1:CHRM1.C03 03/11/19 17:06:30

** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	3.583	1348	64	V		0.0511	
	4	4.171	6811	542	V		0.2584	
	5	4.558	31811	2909	V		1.2069	
	6	5.51	2366	130	V		0.0898	
	7	6.258	336520	26990	V		12.768	
	8	7.021	35225	2487	V		1.3365	
	9	7.634	439691	29656	V		16.6821	
	10	8.474	1745755	84745	SV		66.2362	
	11	10.147	36124	1947	T		1.3706	
TOTAL			2635650	149470			100	

図 6. 尿（ラット）を試料とした HPLC クロマトグラム の例.

6.258 分が内部標準のイソニコチンアミド.

7.031 分がニコチンアミド

7.634 分が 2-Py.

8.474 分が 4-Py.

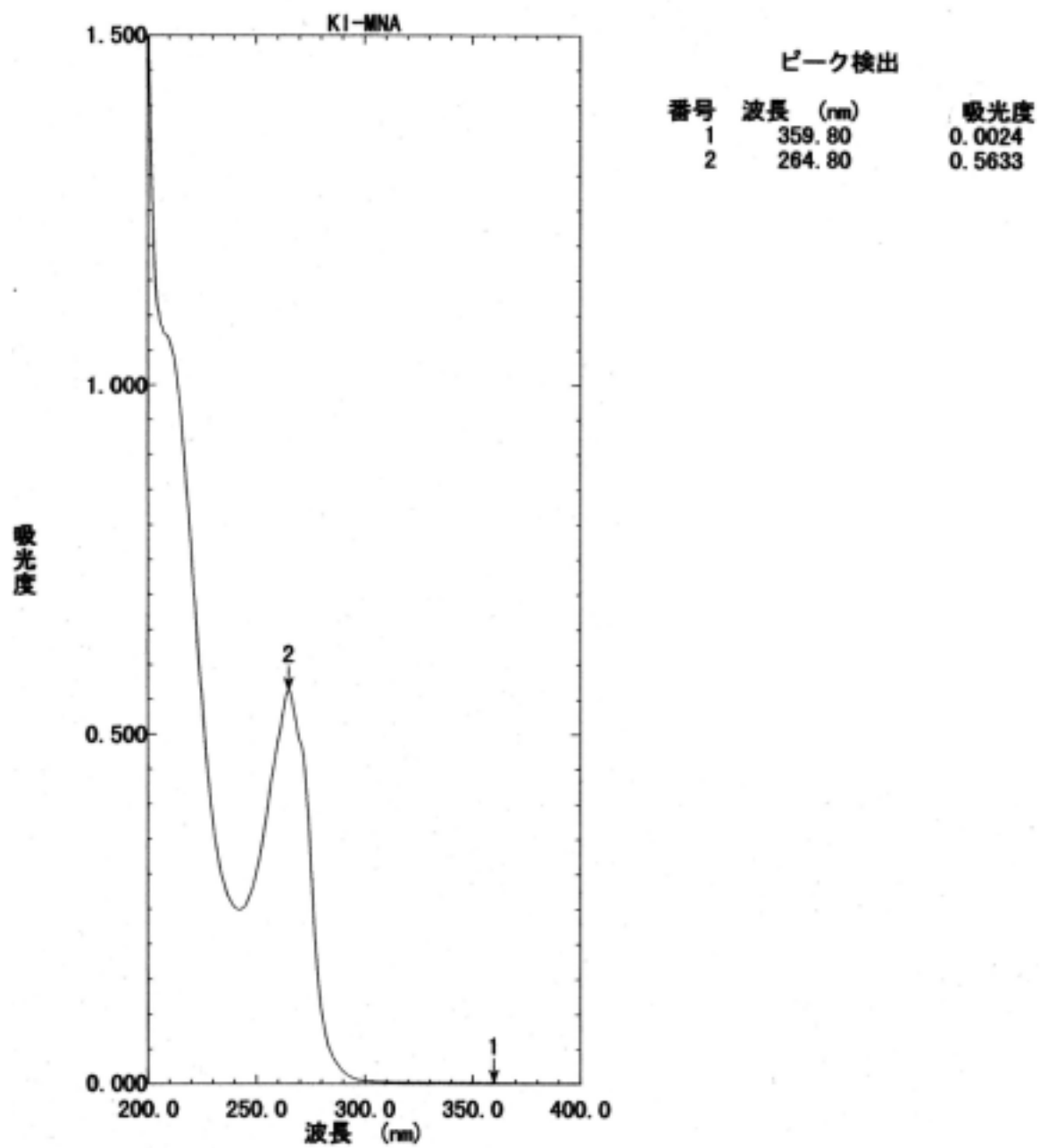


図 7. MNA の UV スペクトラム

MNA 用ねじ口試験管使用

- ・尿——尿 100 μ l + 水 100 μ l = total 800 μ l
- ・標準——1) 20 μ g / ml MNA 標準溶液 20 μ l + 水 780 μ l = total 800 μ l

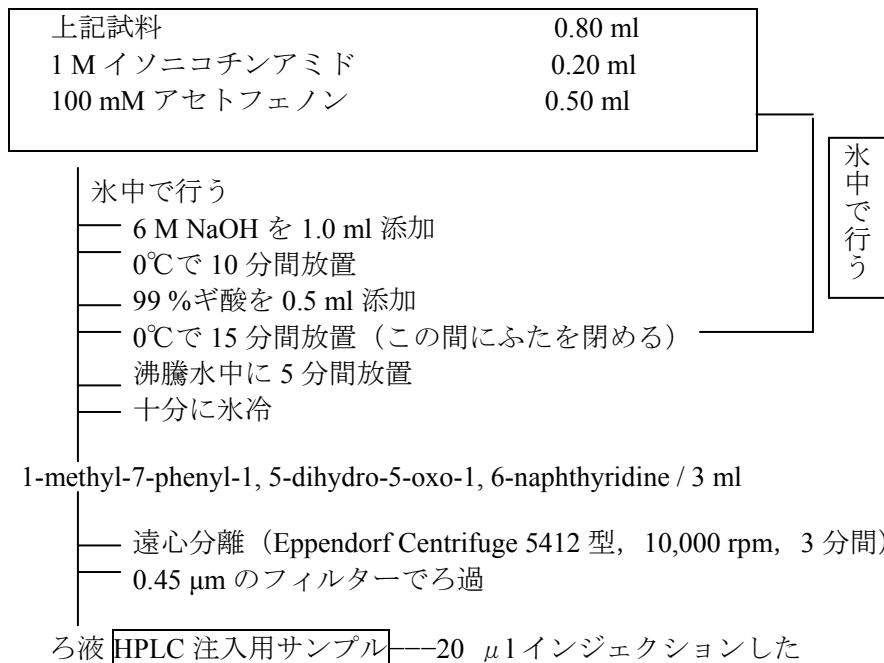


図 8. 尿を用いた時の MNA 定量のための試料作成の方法

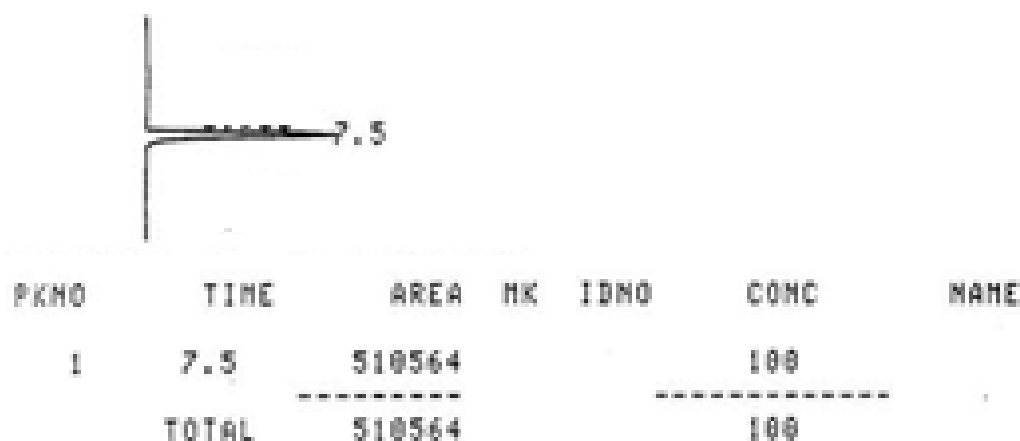


図 9. 標準の MNA を誘導体化した化合物の HPLC クロマトグラムの例

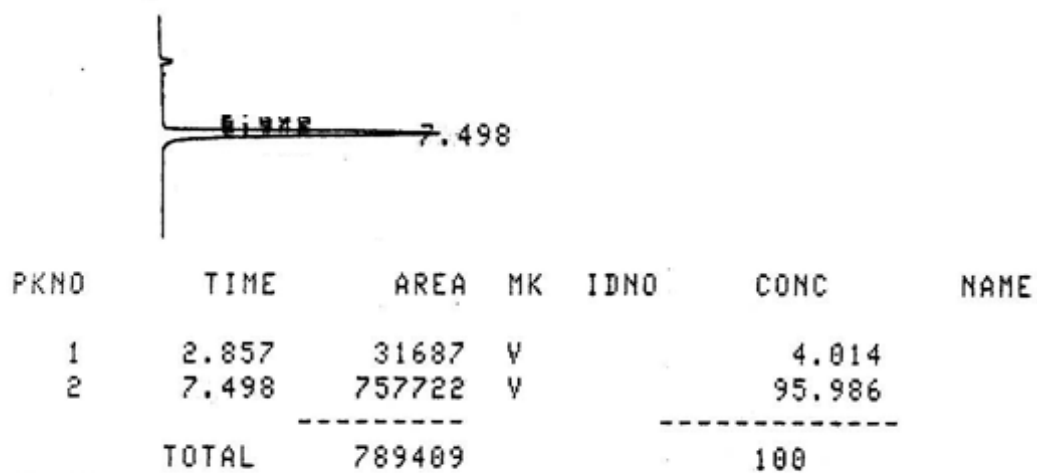


図 10. 尿を試料とした時の HPLC クロマトグラム の例 (MNA の測定)

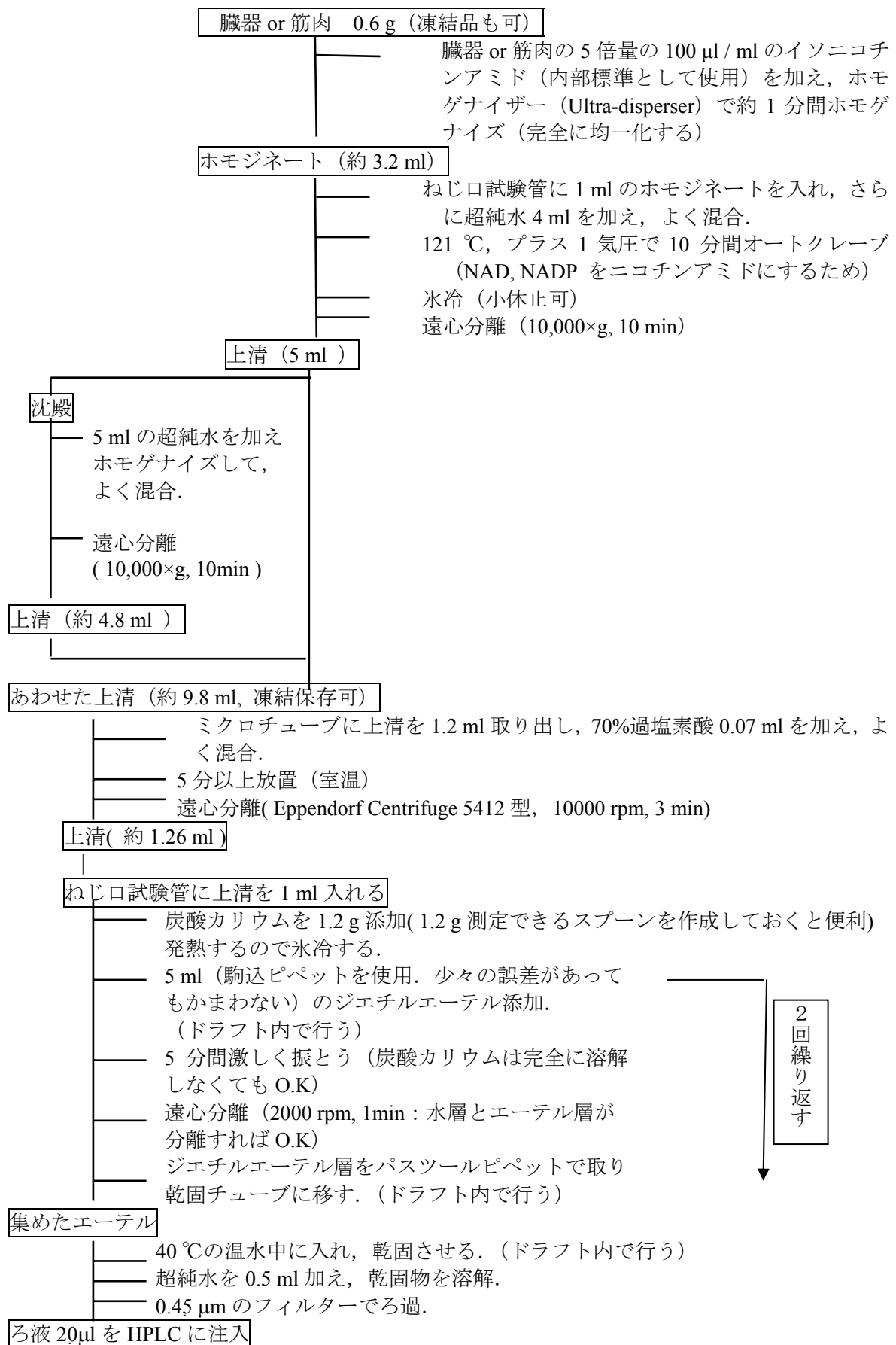


図 11. 生体試料を用いた時のニコチンアミド測定のための HPLC 注入試料の作成方法

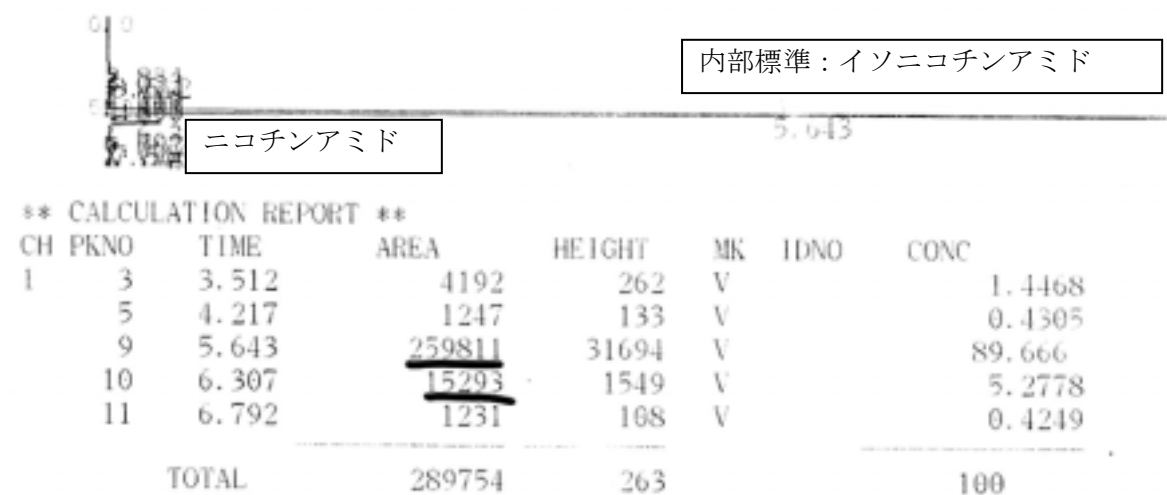


図 12. 鯉筋肉を試料としたときの HPLC クロマトグラムの例
 5.643 分が内部標準のイソニコチンアミド.
 6.307 分がニコチンアミド.