

II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

6. パントテン酸の定量方法

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

研究要旨

本研究で使用したパントテン酸の測定方法についてまとめた。

A. 実験方法

1. 微生物定量法による尿中パントテン酸排泄量測定方法

1-1. 試薬作成方法

0.5M KPb (pH7.0)

1) 0.5 M KH_2PO_4

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

$0.5 \times 136.09 \times 500/1000 = 34.609 \text{ g}$

34.6g 秤量し、超純水を加え溶解させ、500ml 定容。

2) 0.5 M K_2HPO_4

$\text{K}_2\text{HPO}_4=174.18$ （和光純薬株式会社、室温保存）

$0.5 \times 174.18 \times 500/1000 = 43.545 \text{ g}$

43.5g 秤量し、超純水を加え溶解させ、500 定容。

3) 1)に 2)を加え pH7.0 に調製。

0.9%滅菌 NaCl

$\text{NaCl}=98.08$ （和光純薬株式会社、室温保存）

1) 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℃, 5min）し冷却後、冷蔵保存する。

パントテン酸標準液 (1nmol/ml)

※当日調製

パントテン酸カルシウム* = 476.54

（和光純薬株式会社、冷蔵保存）

1) 0.04765 g (約 0.047 g) 秤量し、超純水 1ml を溶解させる。→0.1 mM

2) 1) 10 μl に対し 超純水 990 μl 加えよく攪拌する。（100 倍希釈）→1 μM

3) 2) 10 μl に対し 超純水 990 μl 加えよく攪拌する。（100 倍希釈）

→10 nM PaACa soln. (=20 nM PaA soln)

4) 3) 80 μl に対し超純水 1520 μl 加えよく攪拌する。（20 倍希釈）→1 μM (= 1 nmol/ml)

*パントテン酸カルシウム 1 モルを水に溶解させるとパントテン酸 2 モル溶液になることに注意。〔D-パントテン酸 (MW 219.24)〕

保存用培地、斜面培地

一般乳酸菌用培地（日本製薬株式会社、室温保存）。その組成を表 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 定容。

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℃, 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）。

液体培地

一般乳酸菌用培地

（日本製薬株式会社、室温保存）

1) 培地 3.6g 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) 微生物定量用試験管（12×100mm）に 5ml ずつ分注し、アルミキャップをして、5 分間、121℃, プラス 1 気圧でオートクレーブにかけた後、氷冷する。冷蔵保存。

パントテン酸定量用培地

パントテン酸定量用培地（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 7.7g を秤量し、水を加え、沸騰水浴中で完全溶解後、100ml 定容。

1-2. 試料作成方法

ヒト（通常食）尿 50～25 μ l

ラット（20%カゼイン食：通常食）尿 25 μ l

1-3. 定量操作方法

①接種用菌の作成方法

- 1) *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 の植えてある保存用培地から菌体を白金耳で取り、斜面培地に菌体をタッチミキサーでよく混ぜた後、遠心分離（3000rpm, 10 分間）し、沈殿部分の菌体を得る。
- 1) 菌体に 0.9%滅菌 NaCl, 5ml に懸濁し、遠心分離（3000rpm, 5 分間）後、再び 0.9%滅菌 NaCl, 5ml で洗浄する。この操作を計 3 回行う。
- 2) 最終的に集めた菌体を 0.9%滅菌 NaCl, 5ml に懸濁させる。さらにその懸濁液 50 μ l を 0.9%滅菌 NaCl, 5ml に懸濁させる。これを接種用菌とする。

②定量操作

- 1) 表 3 の溶液を定量用試験管(12×75mm)に分注する。検量線用、試料共に 3 連で行うが、No.0 は 1 本のみで、菌を接種しないこと。（雑菌の繁殖がないことを確認するため）
- 2) 分注した試験管にキャップをし、オートクレーブ（5 分間、121℃、プラス 1 気圧）後、水冷する。
- 3) 調整した接種用菌を 50 μ l ずつ分注する（無菌操作）。
- 4) 30℃、18～24 時間培養する。
- 5) 分光光度計を 660nm の波長にし、No.0 の欠菌の試験管で 0 合わせを行う。
- 6) 全ての試験管の吸光度を測定する。標準溶液の吸光度から検量線を作成し、未知試料中の葉酸濃度を算出する。

1-4. 計算方法

検量線（図 1）から標準の方程式を求める（ $y = ax + b$ ）。

一日の尿中パントテン酸排泄量（nmol/day）
= [(試験溶液の吸光度-b) / a] / 試験溶液中の尿量（ml）× 希釈倍数 × 1 日尿量（ml）

（例）

1. ラット尿（20%カゼイン食=通常食）
吸光度=0.280, $y=2.356x+0.057$, 尿量=25ml

$$[(0.280-0.057)/2.356] / 0.025 \times 100 \times 25/1000 = 9.5 \mu\text{mol/day}$$

1) ヒト尿（通常食）

吸光度=0.108, $y=2.339x+0.013$, 尿量=825ml

$$[(0.108-0.013)/2.339/0.025 \times 10 \times 825/1000] = 13.45 \mu\text{mol/day}$$

2. 微生物定量法による生体試料及び食品中パントテン酸量測定方法

2-1. 試薬作成方法

50 m MKPB buffer (pH7.0)

1) 50 m M KH_2PO_4

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

$$0.05 \times 136.09 \times 500/1000 = 3.402 \text{ g}$$

3.40g 秤量し、超純水を加え溶解させ、500ml 定容。

2) 50mM K_2HPO_4

$\text{K}_2\text{HPO}_4=174.18$ （和光純薬株式会社、室温保存）

$$0.05 \times 174.18 \times 500/1000 = 4.354 \text{ g}$$

4.35g 秤量し、超純水を加え溶解させ、500ml 定容。

3) 1)に 2)を加え pH7.0 に調製。

0.5 M Tris-HCl (pH 8.3)

2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1, 3-プロパンジオール=121.14

$$0.5 \times 121.14 \times 200/1000 = 12.114$$

Tris を 12.114 g 測り取り約 100 ml の超純水に溶かし、HCl にて pH 8.3 に調整後、超純水で 200 ml 定容。

50 % glycerol

グリセリン(Glycerol)=92.09 assay : 99.0%（和光純薬株式会社、室温保存）

glycerol 20 g 秤量し、超純水 20 ml を加え混合。

0.02 M KHCO_3

炭酸水素カリウム=100.12

（和光純薬株式会社、室温保存）

$$0.02 \times 100.12 \times 100/1000 = 0.2002$$

KHCO_3 を 0.20 g 秤量し、超純水加え溶解後、超純水で 100 ml 定容。

15 μ g/ml 還元グルタチオン (Tris soln.)

グルタチオン（還元）=307.33

1) グルタチオンを 0.015 g 秤量し 1 ml の Tris-buffer (pH8.3) に溶解 →15mg/ml

2) さらに 100 倍希釈：10 μ l, Tris-HCl (pH 8.3) 990 μ l → 150 μ g/ml

3) さらに 10 倍希釈：100 μ l, 0.5 M Tris-HCl

(pH 8.3) 900 μ l $\rightarrow$ 15 μ g/ml

腸ホスファターゼ

(Phosphatase, Alkaline from calf intestine, SIGMA P7923, 2000 units, 冷蔵)

- 1) 50 % glycerol, 1 ml を試薬容器に直接入れ静かに攪拌。(激しくすると泡立つ)
 $\rightarrow$ 2000 U/ml
- 2) さらに 10 倍希釈：酵素 10 μ l, 50 % glycerol 90 μ l $\rightarrow$ 200 U/ml
- 3) さらに 20 倍希釈：酵素 20 μ l, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3) 380 μ l
 $\rightarrow$ 10 U/ml

ハト肝アミダーゼ

Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376, 10 g., -20 $^{\circ}$ C 蔵
作成方法を図 2 に示す。

0.5MKPB buffer (pH7.0), 0.9%滅菌 NaCl, パントテン酸標準液, 保存培地, 斜面培地, 液体培地, 定量培地は 1-1.試薬作成方法と同様.

2-2. 試料作成方法

図 3 に生体試料及び食品からの総パントテン酸の抽出法を, 図 4 に結合型パントテン酸の加水分解法を示した。

2-3. 定量操作方法

1-3.と同様.

2-4. 計算方法

検量線から標準の方程式を求める. ($y=ax+b$)

パントテン酸排泄量 (nmol/day)

$= [(\text{試験溶液の吸光度}-b) / a] / \text{試験溶液中の試料量 (ml)} \times 4.5(\text{ml}) / 0.1 (\text{ml}) \times 10(\text{ml})$

4.5ml = 加水分解で得られた試料量,

0.1ml = 加水分解に用いた試料抽出液量,

10ml = 試料抽出時に加えた buffer 量

(例)

1. ラット (20%カゼイン食：通常食) 肝臓中パントテン酸量

$[(0.131 + 0.033) / 3.363] / 0.1 \times 4.5 / 0.1 \times 10 = 220.5 \text{ nmol/g of liver}$

※吸光度=0.131, $y=3.363x-0.033$,

2. ラット (20%カゼイン食：通常食) 血液中パントテン酸量

$[(0.069 + 0.033) / 3.363] / 0.3 \times 4.5 / 0.1^{*1} \times 1 / 0.1^{*2} = 45 \text{ nmol / ml of blood}$

※吸光度=0.069, $y=3.363x-0.033$,

4.5ml = 加水分解で得られた試料量,

*¹ 0.1ml = 加水分解に用いた試料抽出液量,

*² 0.1ml = 抽出処理に用いた血液量

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

表1. 一般乳酸菌培地の組成

試薬	重量 (g)
酵母エキス	5.5
ペプトン	12.5
ブドウ糖	11.0
リン酸二水素カリウム	0.25
リン酸一水素カリウム	0.25
酢酸ナトリウム	10.0
硫酸ナトリウム	0.1
硫酸マンガン	0.005
硫化第一鉄	0.005

表2. パントテン酸定量用培地の組成

試薬	重量 (g)
カザミノ酸	14
L-システイン	0.4
DL-トリプトファン	0.2
硫酸アデニン	0.02
塩酸グアニン	0.02
ウラシル	0.01
塩酸チアミン	0.0002
リボフラビン	0.0004
p-アミノ安息香酸	0.0002
ビオチン	0.0000008
ニコチン酸	0.001
塩酸ピリドキシン	0.0008
リン酸二水素カリウム	1
リン酸一水素カリウム	1
硫酸マグネシウム	0.4
硫化第一鉄	0.02
硫酸マンガン	0.02
酢酸ナトリウム (無水)	20
ぶどう糖	40

表3. パントテン酸の定量操作方法（全容量、2ml）

No.	PaA final conc (nmol/tube)	1nmol/ml PaA(μl)	H ₂ O (μl)	Buffer (μl)	Medium (ml)	Total (ml)
0	0.000	0	800	200	1	2
1	0.010	10	790	↓	↓	↓
2	0.025	25	775			
3	0.050	50	750			
4	0.075	75	725			
5	0.100	100	700			
6	0.150	150	650			
Sample	x	(*)	800-*	↓	↓	↓

* 5～25μl

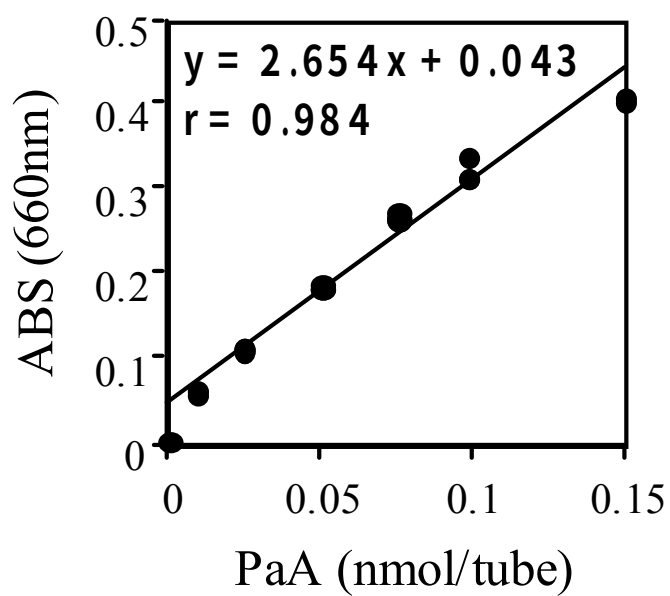


図1. パントテン酸の検量線の一例

Liver acetone powder from pigeon, SIGMA L8376, 10 g, 38,500 円, -20 °C 保存

Acetone powder 0.5 g を秤量瓶に入れ, 回転子を入れ氷冷

↓←10 倍量の 0.02 M KHCO_3 を入れる (5 ml)

静かに攪拌 (激しくすると泡立つ)

↓ 冷却遠心分離 15,000 rpm, 5 min, 4°C

上清

↓←Dowex 1x8 (Cl^-) ※ を添加 (1:1 vol/vol)

↓ 冷却遠心分離 15,000 rpm, 5 min, 4°C

アミダーゼ溶液 *小分けし冷凍保存 (-20 °C)

※イオン交換樹脂活性化方法

1) 1N HCl 溶液

HCl (11.6M) (和光純薬)を超純水で 12 倍希釈する.

2) 1N KOH 溶液

KOH (M.w 56.11) (和光純薬) 5.611g を超純水 80ml に溶かし, 超純水で 100ml 定容.

3) Dowex 1x8 (Cl^-)調製方法

Dowex 1x8 (Cl^-) (ムロマチテクノス株式会社) 10g

↓←1N HCl 100ml (Dowex の 10 倍量)

攪拌 10min

↓

ろ過 (超純水で洗いながら)

↓← 1N KOH 100ml (Dowex の 10 倍量)

攪拌 10 min

↓

ろ過 (超純水で洗いながら)

↓← 1N HCl 100ml (Dowex の 10 倍量)

攪拌 10min

↓

ろ過 (超純水で十分に洗う)

↓←0.5 M Tris-HCl (pH 8.3)で pH 8.0 に調整

懸濁液 (冷蔵保存, 2 日以内に使用) 使用時にろ過し, 沈殿を用いる.

図 2. アミダーゼの調製方法

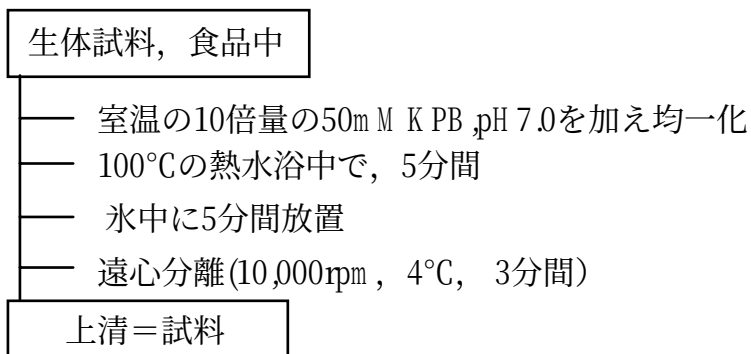


図3. 食品中からの総パントテン酸の抽出方法

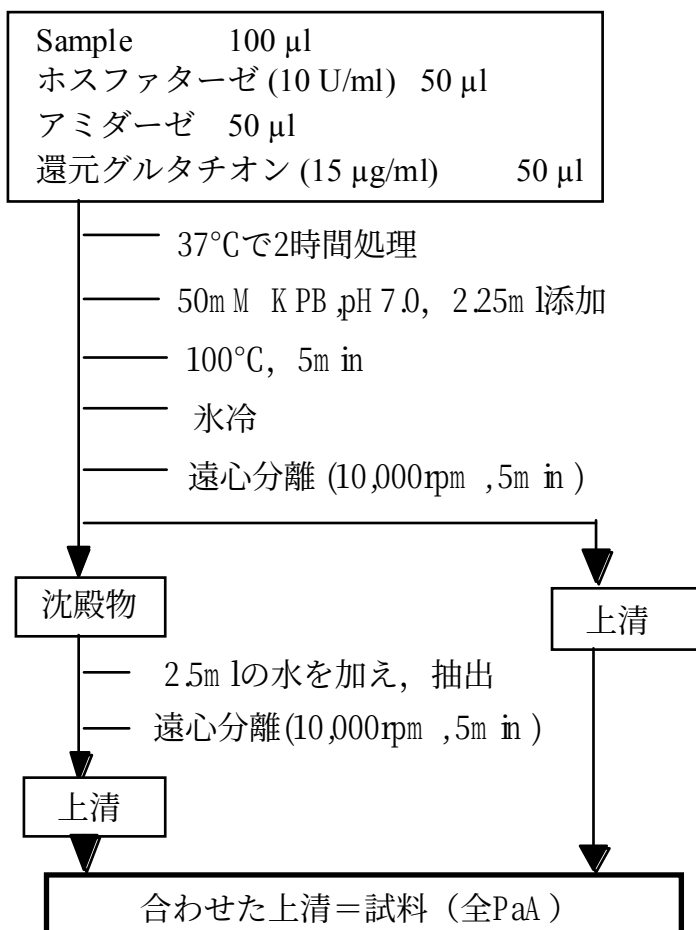


図4. 結合型パントテン酸の加水分解方法