

平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

2. 水溶性ビタミンの測定法の検討 –ビタミン B₆–

分担研究者 早川享志 岐阜大学 教授

研究要旨

本研究に使用するビタミン B₆ 関連化合物の測定方法についてまとめた.

A. 目的

日本人の水溶性ビタミンの必要量を求めるためには、ヒトを用いた人体実験が主体となるが、ヒトで行う実験には限りがあり、動物を用いた動物実験による検討も並行して行う必要がある。そこで、ビタミン B₆ の評価に関して必要な測定法について食品サンプル、ヒトサンプル、ラットサンプルに関してビタミン B₆ 関連物質の測定法についてまとめ、今後の研究の基礎とする。

B. 実験方法

1. 微生物定量法による総ビタミン B₆ 量の測定法

1-1. 試薬

保存用培地（斜面寒天培地）の作成

凍結 YM 保存培地は、酵母エキス 3.0 g、麦芽エキス 3.0 g（いずれも Difco Laboratory 製）、ポリペプトン（日本製薬株式会社製）5.0 g、ブドウ糖 10.0 g をミリ Q 水 100 mL に溶解して調製した。凍結保存可能であるので凍結保存し、使用時にはこの培地を解冻後、希塩酸で pH5.0 とし、ミリ Q 水で 10 倍に希釈する。この希釈培地に寒天 3 % (W/V) を加え加熱溶解後、6 mL ずつ試験管に分注し、シリコン栓をして 121°C で 15 分オートクレーブ滅菌をした後、斜め台に静置しスラント（傾斜寒天培地）とする。

接種菌液の調製

ビタミン B₆ 定量用菌株は *Saccharomyces cerevisiae* 4228 (ATCC 9080) を使用した。保存菌株用のスラントから新しいスラントに継代を行い、30°C で 20 時間程度培養する。ここから 1 白金耳の菌をとり、予め 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した生理食塩水 20 mL に懸濁する。

ビタミン B₆ 定量用培地

ビタミン B₆ 定量用基礎培地（ニッスイ製薬株式会社）6.5 g をミリ Q 水に溶解し、希塩酸で pH を 5.0 とした後、100 mL とする。

ピリドキシン標準溶液の調製

ピリドキシン塩酸塩 60.8 mg をミリ Q 水に溶解し、ミリ Q 水で 50 mL としたピリドキシン保存溶液（ピリドキシンとして 1 mg/mL）をミリ Q 水で希釈してピリドキシン標準溶液（1 ng/mL）とする。この濃度補正は、ピリドキシン保存溶液 0.5 mL に 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）10 mL を加え、ミリ Q 水で 20 mL とした希釈液について、325 nm あるいは 253 nm における吸光度を求め、 $\epsilon_{325} = 7,100$ あるいは $\epsilon_{253} = 3,700$ を用いて正確

な濃度を求め、ピリドキシン濃度を補正する。ビタミン B₆ は光に対して不安定であるので、ビタミン B₆ を扱う操作はすべて暗所あるいは薄暮照明の部屋で行い、試料溶液は褐色容器に入れ氷冷保存する。以下のビタミン B₆ を含むサンプルについては同様の注意を払う必要がある。

1-2. 分析試料調製方法

食品サンプルの場合

粉碎またはホモジナイズした試料 1 g を 100 mL 容の三角フラスコに採取する。植物性試料の場合は、0.44 M 塩酸 80 mL を、動物性試料の場合は、0.055 M 塩酸 80 mL を加えて 121°C (+1 気圧条件下) でそれぞれ 2 時間あるいは 5 時間オートクレーブする。常圧にまで圧力が下がったらすぐに取り出し冷却後 10 M 水酸化ナトリウムで pH5.0 として 100 mL に定容し、ひだ付濾紙 (ADVANTEC No. 5B) で濾過し、食品抽出液サンプルとして保存する（冷凍保存可能）。定量に際してはピリドキシンとして 1 ng/mL 程度にミリ Q 水で希釈する。なお、濾過する場合には、最初の濾過液は採取しないこと。

尿サンプルの場合

尿（ラットおよびヒト）は回収後 1500 x g, 4°C で 10 分間遠心分離した上清を尿サンプルとし、-40°C で保存する。尿サンプル 1.0 mL に 0.055 M 塩酸を 80 mL 加え、121°C で 5 時間オートクレーブを行いビタミン B₆ を抽出する。得られた抽出液を 10 M 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整後、100 mL に定容し、ひだ付濾紙 (ADVANTEC No. 5B) で濾過する。これを尿抽出液サンプルとする（凍結保存可能）。定量する場合には、この尿抽出液サンプルをさらにミリ Q 水で適度に希釈する。

糞サンプルの場合

ラット糞については、ADVANTEC No. 2 濾紙を敷いたトレイ上に採取した糞を回収し -40°C で保存した後、24 時間凍結乾燥し、MILLSER (FOODS MILL, Iwatani) で粉碎する。粉碎糞 0.50 g に 0.055 M 塩酸を 40 mL 加え、121°C で 5 時間オートクレーブを行いビタミン B₆ を抽出する。得られた抽出液を 10 M 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整後、50 mL に定容し、ひだ付濾紙 (ADVANTEC No. 5B) で濾過する。これを糞抽出液サンプルとする（凍結保存可能）。定量する場合には、この糞抽出液サンプルをさらにミリ Q 水で適度に希釈する。

1-3. 総ビタミン B₆ 定量操作方法

定量の前日に保存菌株より新しいスラン

トへ継代を行い、30℃で 20 時間培養する。各抽出液サンプル 0.5 mL, ミリ Q 水 2.0 mL を試験管に入れ、さらにビタミン B₆ 定量用培地 (ビタミン B₆ 定量用基礎培地 6.5 g をミリ Q 水に溶解し、希塩酸で pH 5.0 に調整後、全量を 100 mL としたもの) を 2.5 mL 添加し、シリコン栓をして 121℃で 15 分間オートクレーブを行い滅菌する (測定培地)。あらかじめ菌を培養しておいたスラントから 1~2 白金耳の菌を取り、121℃で 15 分間オートクレーブした滅菌生理食塩水 20 mL に懸濁したものを接種菌液とする。滅菌した測定培地に接種菌液を 30 μ L 添加し、恒温振とう器 (Taitec Bio Shaker BR-30L) を用いて 30℃で 20 時間振とう培養 (200 rpm) する。培養後 10 分間沸騰湯浴中で煮沸し、そのときの菌の生育度を分光光度計を用いて 600 nm の吸光度にて測定する。

ビタミン B₆ 標準曲線は、試験管あたり 0~2.0 ng ピリドキシンの範囲で作成し、その回帰式を用いてサンプル中の総ビタミン B₆ 量を算出する。なお、ピリドキシン 0 ng の標準サンプルのうち 1 本には菌を添加せず培地ブランクとし、他の菌の混入がないことを確かめる。

計算方法

各試験管に含まれるピリドキシン相当量 (ng) を検量線より求め、使用した希釈率、使用した希釈抽出液サンプル量を考慮して抽出液サンプル 1 mL あたりのピリドキシン相当量から対象試料 1 g あるいは 1 mL あたりのピリドキシン相当量を求める。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析方法

2-1. 試薬

ピリドキシン (PN), ピリドキサミン (PM), ピリドキサル (PL), ピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP), ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) および 4-ピリドキシン酸 (PIC) は 5mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) で 500nM 溶液を調製し、標準溶液とする。

2-2. 分析試料調製方法

血漿過塩素酸 (PCA) 抽出液の調製

血漿 (ラットあるいはヒト) 1 mL に 3M 過塩素酸 (PCA) を 0.5 mL 加え、良く混合後、高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4℃) を行いタンパク質の除去を行う。得られる上清に 1.0 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を 0.4 mL 加え、5M 水酸化カリウムにて pH 3.5 に調整し、4 mL に定容したものをラット

血漿 PCA 抽出液とする。この血漿 PCA 抽出液 2 mL を再び高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4℃) し、塩を除去した後 4 mL に定容する。これを 0.45 μ m のメンブランフィルターに通し、このうち 200 μ L を後述の B₆ ビタマーの HPLC 分析 (HPLC 分析条件 A) に供する。

PLP は PCA 抽出液そのままでは蛍光強度が低いので、定量することが難しい。そこで、KCN 処理を行って PLP を 4-ピリドキシン酸 5'-リン酸 (PIC-P) へ誘導化することにより蛍光強度を高めた後、別途高感度で定量する。そのためには、上記の血漿 PCA 抽出液 2 mL を 5 M 水酸化カリウムで pH 7.5 に調整し、高速微量冷却遠心機 MR-150 で 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4℃) を行い、塩を除去する。得られた上清に 0.1 M シアン化カリウム (KCN) 100 μ L を加え、50℃で 3 時間振とうしながらインキュベートする。液温を常温に戻し、ラットの場合は、1 M 塩酸で pH 3.5 に、ヒトの場合は、0.1 M 塩酸で pH 5.5 に調整し、25℃の恒温槽中で 24 時間放置する。放置後 4 mL に定容し、0.45 μ m のメンブランフィルターに通し、このうち 200 μ L を HPLC 分析 (ラットの場合は HPLC 分析条件 B, ヒトの場合は HPLC 条件 C) に供する。

母乳 PCA 抽出液の調製

母乳は採取後、すぐに -20℃で凍結保管し、その後分析までは -40℃で保存した。解凍後、緩やかに攪拌し、1 mL をとり、血漿の場合と同様に PCA 抽出液を調製した。各 B₆ ビタマーは HPLC 分析条件 A により、PLP は、KCN 処理後 HPLC 条件 B により分析する。

ラット臓器 PCA 抽出液の調製

ラット臓器 1 g あたり、3 mL の冷生理的食塩水を加えホモジナイザー (HG30 Homogenizer HITACHI Co., Tokyo, Japan) で緩やかにホモジナイズし、さらに 5 M の PCA 1 mL を加えて再度緩やかにホモジナイズした後、高速微量冷却遠心機 MR-150 で 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4℃) を行いタンパク質の除去を行う。得られた上清に 1.0 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を 0.6 mL 加え、5M 水酸化カリウムにて pH 3.5 に調整し、8 mL に定容する。この臓器 PCA 抽出液を再び高速微量冷却遠心機 MR-150 で 10 分間遠心分離 (12,000 rpm, 4℃) し、塩を除去した上清を臓器 PCA 抽出液とする。臓器 PCA 抽出液の一部を 0.45 μ m のメンブランフィルターに通し、このうち 200 μ L を HPLC 分析

(HPLC 分析条件 A) に供する。

臓器 PCA 抽出液中 PLP はラット血漿 PCA 抽出液と同様な方法により KCN 処理により PIC-P に変換後、HPLC 分析 (HPLC 分析条件 B) に供する。

尿 PCA 抽出液の調製

尿 (ラットあるいはヒト) は回収した後、10 分間遠心分離 ($1,500 \times g$, 4°C) を行い、その上清を尿サンプルとする。尿サンプル 1 mL に 3 M PCA を 0.5 mL 添加後、高速微量冷却遠心機 MR-150 (株式会社トミー精工) で 15 分間遠心分離 ($12,000 \text{ rpm}$, 4°C) し、タンパク質を除去する。得られる上清を 5 M 水酸化カリウムにて pH 2.2 に調整し、塩を含んだまま 4 mL に定容・静置冷却の後、再び高速微量冷却遠心機 MR-150 で 10 分間遠心分離 ($12,000 \text{ rpm}$, 4°C) して塩を除去した上清を $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターにて濾過し、このうち $200 \mu\text{l}$ を HPLC 分析 (HPLC 分析条件 D) に供する。

2-3. HPLC による B_6 ビタマーの分析法

各 B_6 ビタマー標準溶液 (500nM) について 2, 4, 6, 8 倍に希釈し、無希釈のものと合わせて 5 濃度の HPLC 分析用希釈標準溶液とする。PLP 以外のそれぞれのビタミン B_6 分析用希釈標準溶液 1 mL について 0.1 M 塩酸でそれぞれのサンプルの分析条件の pH (3.5 または 5.5) に調整し、ミリ Q 水で 2 mL に定容する。次いで $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターにて濾過した後 $200 \mu\text{L}$ を HPLC 分析に供する。PLP 分析用希釈標準溶液の場合は、そのまま後述する KCN 処理に供した後、 $200 \mu\text{L}$ を HPLC 分析に供する。試料により多少分析条件が異なるので、以下にその詳細を示す。HPLC 分析条件 A (ラット血漿 PCA 抽出液 B_6 ビタマーの分析法)

HPLC 分析装置は以下に示すとおりである。システムコントローラー: TOSOH スーパーシステムコントローラー SC-8020, オートサンプラー: TOSOH オートサンプラー AS-8020, 送液ポンプ: TOSOH マルチポンプ CCPM-II, 恒温槽: TOSOH カラムオーブン CO-8020, 脱気装置: TOSOH オンラインデガッサ SD-8022, カラム: TOSOH TSKgel ODS-120A ($4.6 \text{ mmID} \times 25 \text{ cm}$), 検出器: TOSOH 蛍光検出器 FS-8020, プリンタ: CANON バルブジェットプリンタ BJ-15V。また、HPLC 分析条件は以下に示すとおりである。検出波長: 励起波長 305 nm , 蛍光波長 390 nm , 流速: 0.5 mL/min , 圧力: 約 46 kg/cm^2 , 温度: 30°C , 移動相: $\text{CH}_3\text{CN}/0.1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ - 0.1 M NaClO_4 (pH 3.5) = 1:99 (v/v)。

ラット血漿 B_6 ビタマーの分析例を図 1 に、ヒト血漿 B_6 ビタマーの分析例を図 2 に示す。

HPLC 分析条件 B (ラット血漿 PCA 抽出液 PLP の分析法: KCN 処理法)

HPLC 分析装置は HPLC 分析条件 A と同じである。HPLC 分析条件は、検出波長: 励起波長 320 nm , 蛍光波長 420 nm であること以外は HPLC 分析条件 A と同じである。ラット血漿 PLP の分析例を図 3 に示す。

HPLC 分析条件 C (ヒト血漿 PCA 抽出液 PLP の分析法: KCN 処理法)

HPLC 分析装置は HPLC 分析条件 A と同じである。HPLC 分析条件は、検出波長: 励起波長 320 nm , 蛍光波長 420 nm , 移動相の pH が 5.5 であること以外は HPLC 分析条件 A と同じである。ヒト血漿 PLP の分析例を図 4 に示す。HPLC 分析条件 C (ラット尿 PCA 抽出液中 PIC の分析法)

HPLC 分析装置は HPLC 分析条件 A と同じである。HPLC 分析条件は、検出波長: 励起波長 355 nm , 蛍光波長 436 nm , 流速: 1.0 mL/min , 圧力: 約 140 kg/cm^2 , 温度: 30°C , 移動相: $1.96 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.2) / CH_3OH = 9:1 (v/v) (適当量のミリ Q 水に 85%リン酸 2.3 mL を添加し、5 M 水酸化カリウムで pH 2.2 に調整する。これを 900 mL とし、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターにて濾過した後、HPLC 用メタノール 100 mL を加える) である。ラット尿中 PIC の分析例を図 5 に示す。

C. 健康危機情報

特記する情報なし

D. 研究発表

1. 発表論文
なし
2. 学会発表
なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許予定
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

F. 引用文献

なし

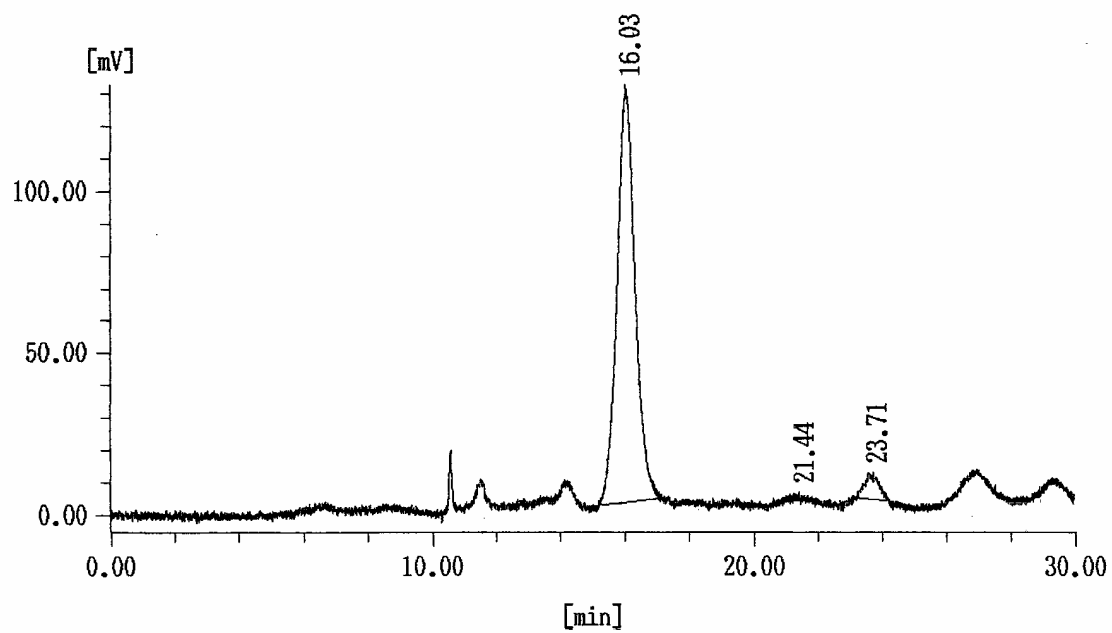


図 1. ラット血漿中 B₆ ビタマーの HPLC 分析クロマトグラムの例

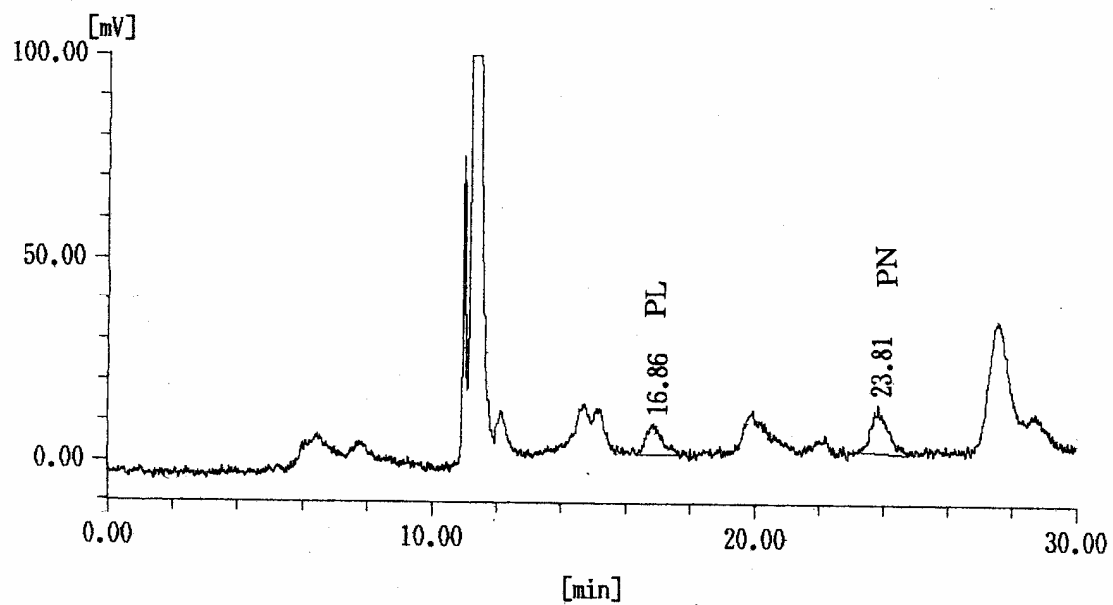


図 2. ヒト血漿中 B₆ ビタマーの HPLC 分析クロマトグラムの例

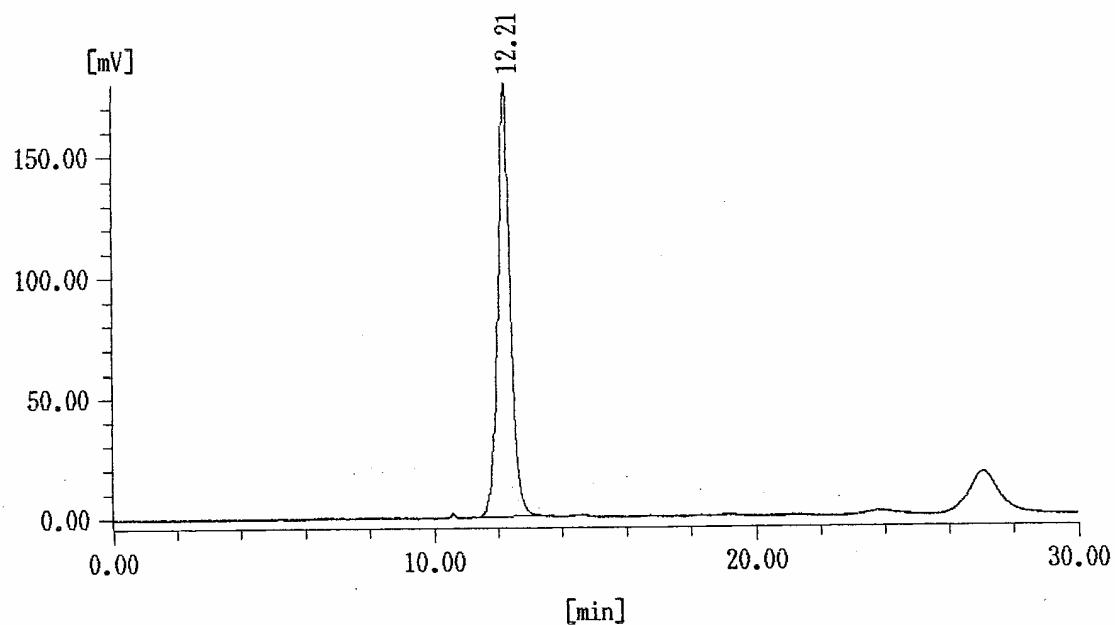


図 3. ラット血漿中 PLP (PIC-P) の HPLC 分析クロマトグラム の例

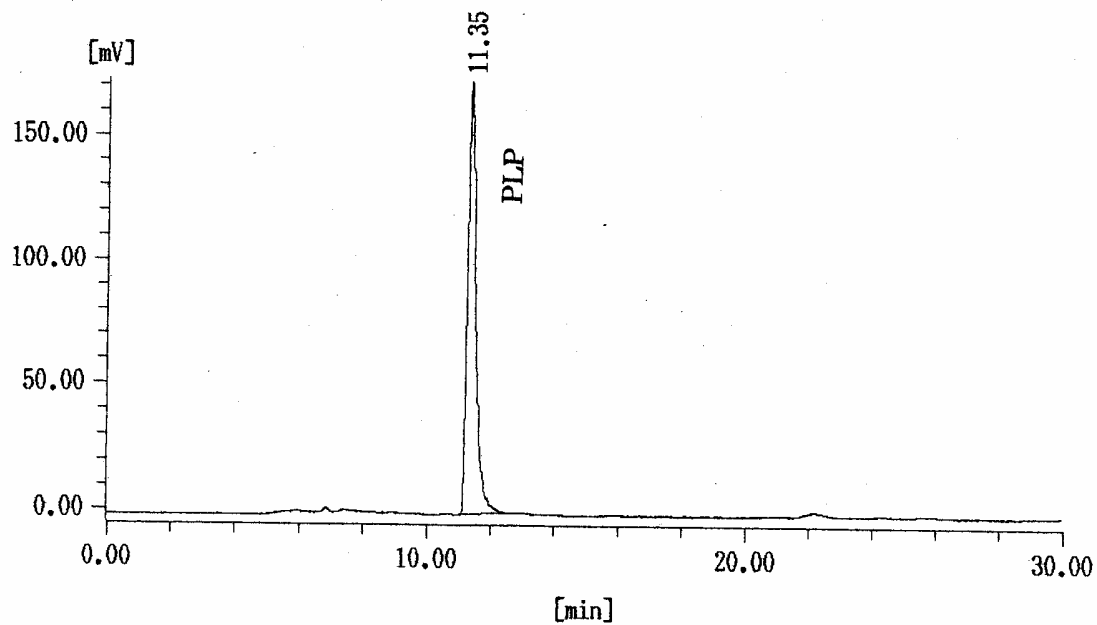


図 4. ヒト血漿中 PLP (PIC-P) の HPLC 分析クロマトグラム の例

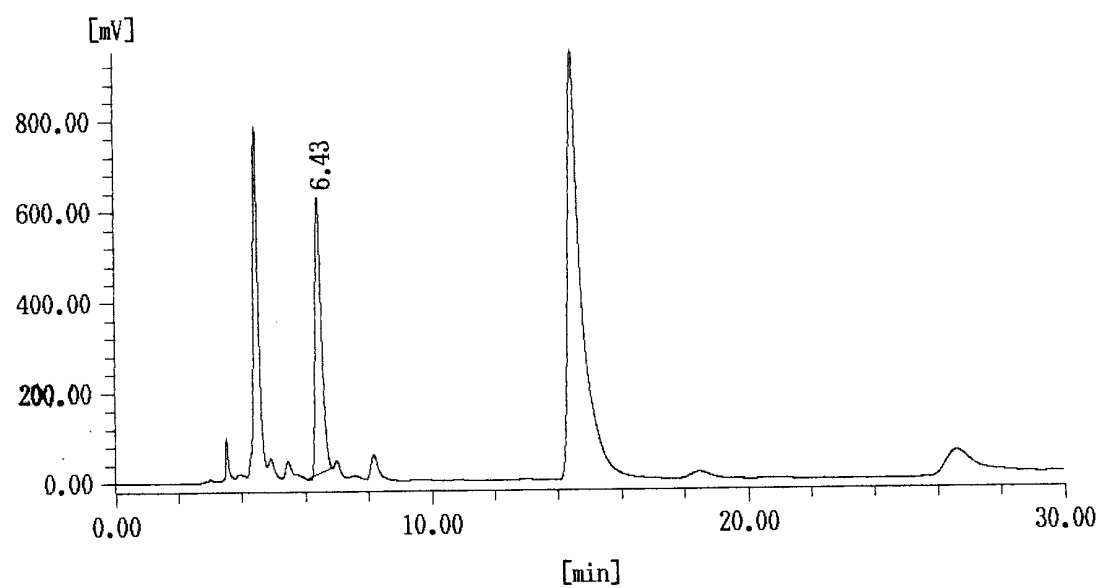


図 5. ラット尿中 PIC の HPLC 分析クロマトグラム例