

PN-HCl 標準 吸光度測定例

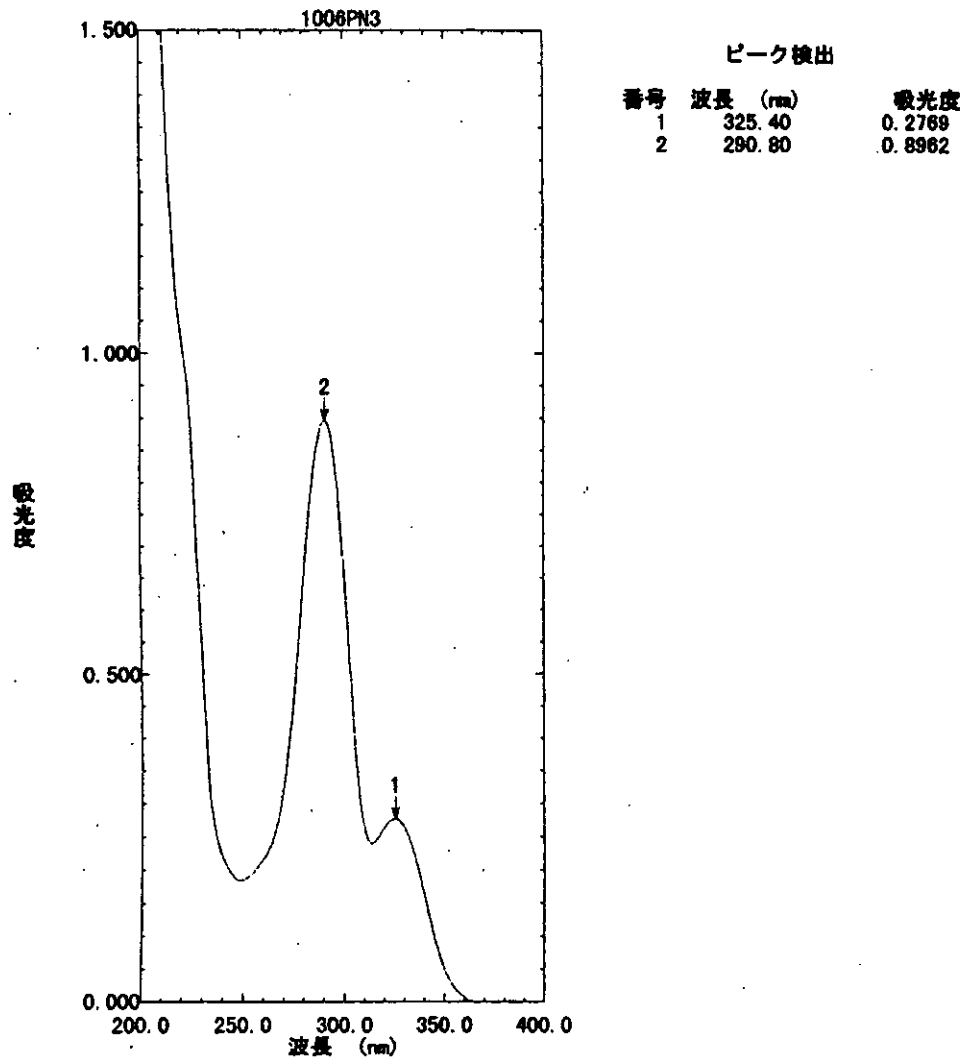


図5. ピリドキシンのUVスペクトラム

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°C, 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 B<sub>6</sub> 測定用の試料調製方法

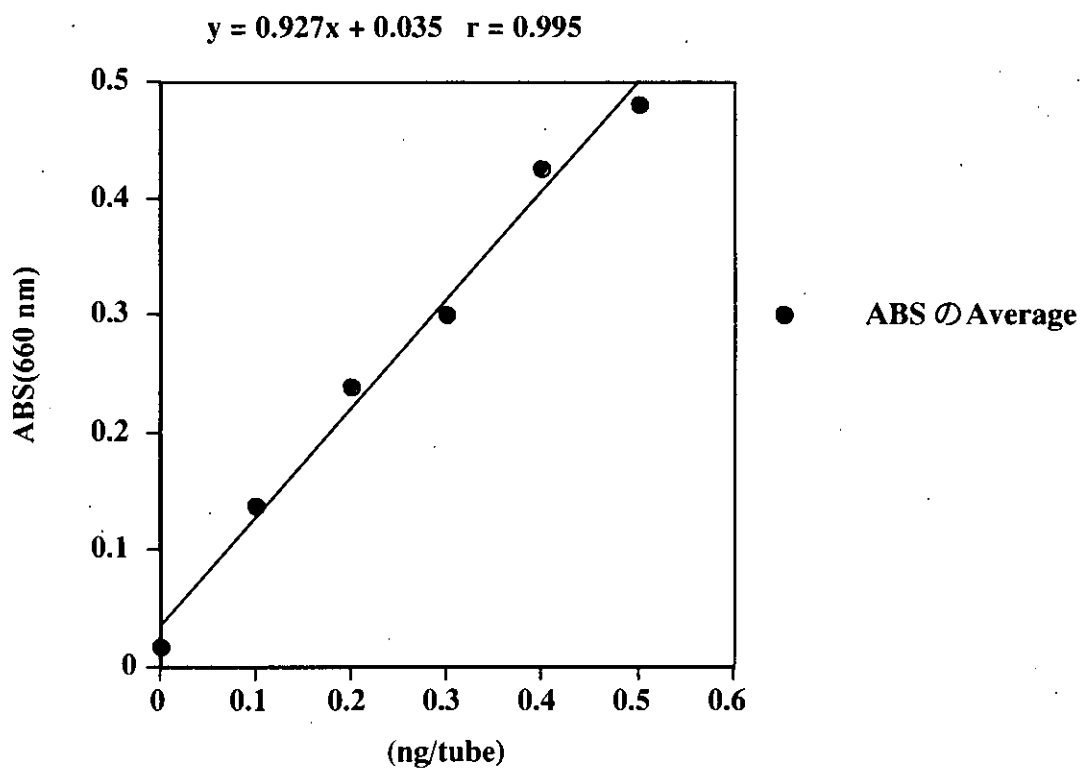


図 7. ビタミン B<sub>6</sub> 測定の検量線の一例

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 B<sub>6</sub>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)	↓

平成15年度厚生労働科学研究費（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

日本人の水溶性ビタミン必要量に関する基礎的研究

主任研究者 柴田克己 滋賀県立大学 教授

## II. 水溶性ビタミン関連化合物の定量方法

### 4. ビタミンB<sub>12</sub>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B<sub>12</sub>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のビタミンB<sub>12</sub>測定方法

##### 1-1. 試薬作成方法

##### V.B<sub>12</sub>標準液 (0.1ng/ml)

Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) = 1355.38 (和光純薬工業株式会社, 冷蔵保存)

- 1) 1mg/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. V.B<sub>12</sub>を0.001g秤量し1mlの25%EtOHを加えて溶かした.
- 2) 50μl/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. 1)を50μl取り, 25%EtOH 950μlを加えて, 20倍希釈した.
- 3) 10μl/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. 2)を600μl取り, 25%EtOH 2400μlを加えて, 5倍希釈した. この溶液の吸光度を測定し, 正確な濃度を求める. UVスペクトルを図1に示した.
- 4) 1μg/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. 3)を500μl取り, 25%EtOH 4500μlを加えて, 10倍希釈した. 冷蔵保存, 以下用事希釈.
- 5) 50ng/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. 3)を50μl取り, 超純水 950μlを加えて, 20倍希釈した.
- 6) 1ng/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. 4)を20μl取り, 超純水 980μlを加えて, 50倍希釈した.
- 7) 0.1ng/mlのV.B<sub>12</sub>を作成. 5)を0.5ml取り, 超純水 4.5mlを加えて, 10倍希釈し, 標準とした.

##### 25%EtOH

Ethanol = 46.07

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

EtOH 25mlに超純水75mlを加え, 100mlにした.

##### 0.1 M KPb (pH6.2)

##### 1) 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 136.09

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

0.1M×136.09×500 / 1000 = 6.8045 (g)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を6.8045 g秤量し, 超純水で500mlにした.

##### 2) 0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 174.18

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

0.1M×174.18×500 / 1000 = 8.709 (g)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を8.709 g秤量し, 超純水で500mlにした.

##### 3) 1)に2)を加え, pH6.2に調製した. (5:1の割合)

##### 0.9% 滅菌生理食塩水

NaCl = 98.08

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

##### 1) NaClを4.5g秤量し超純水で500mlにメスアップする.

##### 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.

##### 10% (w/v) メタリン酸溶液

Metaphosphoric Acid.Lump Assay (as HPO<sub>3</sub>) = min 37.0%

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

メタリン酸 8.108 g秤量し, 超純水にて 30mlにメスアップした.

##### 0.025% KCN (劇薬なので管理に注意)

Potassium Cyanide = 65.12

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

KCN 0.0025 gを秤量し, 10mlの超純水に溶かした.

### 0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.8) (冷蔵保存)

- 1) 0.1 M 酢酸ナトリウム  
Sodium Acetate Trihydrate = 136.08  
(和光純薬工業株式会社, 常温保存)  
酢酸ナトリウム 0.6804 gを秤量し, 超純水にて 50ml にメスアップした。
- 2) 0.1 M 酢酸  
Acetic Acid = 60.05  
(和光純薬工業株式会社, 常温保存)  
酢酸0.5mlに超純水86.5mlを加えた。
- 3) 1) に 2)を加え, pH 4.8 に調製した。(3:2 の割合)

### ライヒマニ保存用培地

日水製薬(株)製のライヒマニ保存用基礎培地を使用した。組成を表1に示した。

#### 寒天 (Agar, Powder)

(和光純薬工業株式会社, 室温保存)

- 1) ライヒマニ保存用培地を10.93gと, 寒天1.5gを秤量し220mlの超純水を加え, 20分くらい煮沸溶解した。
- 2) ねじ口試験管に4mlずつ分注し, オートクレーブ (121°C, 5min) にかけて滅菌した。
- 3) 5分くらい水冷し, 1/3 量は高層, 2/3 量は斜面になるように固めた。
- 4) 冷蔵庫に保存した。

### ライヒマニ接種用培地

日水製薬(株)製のライヒマニ接種用基礎培地を使用した。組成を表1に示した。

- 1) ライヒマニ接種用培地を9.54g秤量し275mlの超純水を加え, 煮沸溶解後10分くらい水冷した。
- 2) 試験管に5mlずつ分注し, オートクレーブ (121°C, 5min) にかけて滅菌した。
- 3) 15分くらい水冷し, 冷蔵庫に保存した。

### V.B<sub>12</sub>定量用培地

日水製薬(株)製のV.B<sub>12</sub>定量用基礎培地を使用した。組成を表2に示した。

- 1) V.B<sub>12</sub>定量用基礎培地を8.3g秤量し80mlの超純水を加え, 煮沸溶解した。
- 2) 10分ほど水冷後, pH6.2±0.1に硫酸にて補正し, 添付のポリソルベート80溶液2.0mlを加えてから全容を100mlにした。これが定量用 2 倍濃度基礎培地となる。

### 1-2. 試料作成方法

図2に試料の作成方法を示した。

### 1-3. 定量操作方法

#### ① 接種用菌液作成方法

- 1) *Lactobacillus leichmanii* ATCC7830 (住商ファーマインターナショナル株式会社) の植えてある保存用培地から菌体を一白金耳取り, 斜面培地に塗布し, 37°Cで20時間培養した。
- 2) 20時間培養した斜面培地から菌体を一白金耳取り, 新しい斜面培地に塗布し, 37°Cで20時間培養した。
- 3) 作成した液体培地に, 斜面培地から菌体を一白金耳取り, 37°Cで20時間培養した。
- 4) これを3000rpmで5分間遠心分離を行い, 沈殿部分の菌体を得る。この菌体を滅菌した5mlの0.9%生理食塩水に懸濁し再び遠心分離し, 菌体を洗浄した。この洗浄操作を5回行った。
5. 最終的に集めた菌体を5mlの滅菌した0.9%生理食塩水に懸濁させた。さらに, その懸濁液を滅菌した0.9%生理食塩水にて透過率85%に調節した。これを接種用菌液とし, ピペットマンで20μlずつ定量用試験管に分注した。

※1 長期間測定を行わない場合は液体培地中で培養した*Lactobacillus leichmanii* ATCC7830を「保存用平面寒天培地」に穿刺して接種し, 37°Cで20時間培養し, 冷蔵庫で保存した(約一ヶ月保存可能)。

※2 保存培地から起こすのは時間がかかるので接種用培地に培養させた菌液を 200μl滅菌エッペン (1.5ml) に入れ-20°Cで凍結保存した。使用時は解凍後, 接種培地に全量入れ, 少なくとも植え継ぎを2回 (2日) してから接種菌液として使用した。

#### ② 定量操作

- 1) 表3の通り溶液をp.p.tube (POLYPROPYLEN tube 12×75 mm) に分注した。
- 2) 検量線用, サンプル用とも3連で行った。
- 3) 標準0濃度のうち1本は盲検として菌液を接種しなかった。
- 4) 分注したp.p.tubeにディスポp.p.キャップをし, オートクレーブ(121°C, 3min, プラス1気

- 庄)にかけ滅菌した。
- 5) オートクレーブ後、直ちに氷冷した。
  - 6) 冷めたら、透過率85%に調整(混濁菌液、約500 $\mu$ lを5ml滅菌生理食塩水に加えた。)した菌液を20 $\mu$ lずつ分注した。
  - 7) 37°Cの孵卵器で16~20時間培養した。
  - 8) 波長 660nmの比濁計で、盲検のtubeで0合わせをした。
  - 9) 懸濁液を均一化してから吸光度を測定した。検量線を引き、計算した。検量線の一例を図3に示した。

#### 1-4. 計算方法

- 1) 検量線よりtube当たりのV.B<sub>12</sub>量 (pg/tube) をもとめた..b
- 2) 尿中V.B<sub>12</sub>量 (ng/day) =b/0.4 (ml) ×1.8 (ml) /0.9 (ml) ×1日尿量 (ml) /1000  
 ※0.4 (ml) =分注した試料量, 1.8 (ml) =試料全量, 0.9 (ml) =使用した尿量  
 (例) ヒト尿 (通常食)  

$$\left[ (0.211 - 0.0634) / 0.005 \right] / 0.4 \times 1.8 / 0.9 \times 794 / 1000 = 117 \text{ ng/day}$$
 ※0.211=吸光度, y=0.005x+0.0634, 794 =全尿量

## 2. 微生物定量法による食品中のビタミンB<sub>12</sub>測定方法

### 2-1. 試薬作成方法

0.05% KCN (劇薬なので管理に注意)

Potassium Cyanide = 65.12

(和光純薬工業株式会社, 常温保存)

KCN 0.01 gを秤量し, 20mlの超純水に溶かした。

0.57 M酢酸緩衝液 (pH 4.5) (冷蔵保存)

#### 1) 0.57M 酢酸ナトリウム

Sodium Acetate = 82.03 (和光純薬工業株式会社, 常温保存)

酢酸ナトリウム 14.03 g秤量し, 超純水にて300mlにメスアップした。

#### 2) 0.57 M 酢酸

Acetic Acid = 60.05 (和光純薬工業株式会社, 常温保存)

酢酸 7mlに超純水 206.5mlを加えた。(30.5倍希釈)

#### 3) 1)に2)を加え, pH 4.8に調製した。

V.B<sub>12</sub>標準液, 25%EtOH, 0.1 M KPB (pH6.2),

0.9% 生理食塩水, 10% (w/v) メタリン酸溶液, 0.025% KCN, 0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.8), 保存培地, 斜面培地, 液体培地は1-1.試薬作成方法と同様。

### 2-2. 試料作成方法

図4に食品の処理方法を示した。

### 2-3. 定量操作方法

#### 1 接種用菌液作成方法

1-3. ①接種用菌液作成方法と同様。

#### 2 定量操作

1-3. ②定量操作と同様。

### 2-4. 計算方法

#### 1) V.B<sub>12</sub>量

1- 検量線よりtube当たりのV.B<sub>12</sub>量(pg/tube) をもとめた..b'

2- V.B<sub>12</sub>量( $\mu$ g / diet)=b'×N×10 (ml) / 0.5(g)×a / 1000000

※ N=試料調整時の希釈倍数, 10 (ml)=定容量,

0.5(g)=処理した食品ホモジネイト量, a =食品ホモジネイト全量

#### 2) アルカリ耐性因子含量

1- 検量線よりtube当たりのアルカリ耐性因子含量(pg / tube)をもとめた..b''

2- アルカリ耐性因子含量( $\mu$ g / diet)=b''×N'×10 (ml)×1.7 (ml) / 1.5 (ml) / 0.5 (g)×a / 1000000

※ N=試料調整時の希釈倍数, 10 (ml)=定容量,

1.7(ml) =アルカリ耐性処理した全量,

1.5(ml) =使用したろ液量

0.5(g)=処理した食品ホモジネイト量,

a =食品ホモジネイト全量

3) V.B<sub>12</sub>含量( $\mu$ g / diet) = V.B<sub>12</sub>量( $\mu$ g / diet) - アルカリ耐性因子含量( $\mu$ g / diet)

### 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

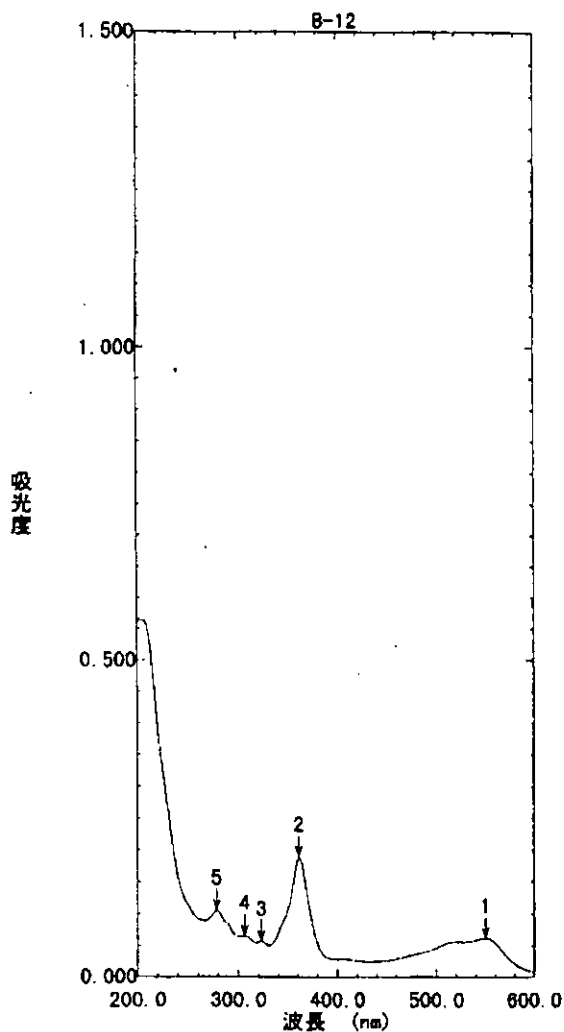
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし





ピーク検出

番号	波長 (nm)	吸光度
1	550.00	0.0611
2	380.80	0.1878
3	322.50	0.0561
4	308.00	0.0647
5	278.00	0.1043

B12 OD (551nm) =  $8.74 \times 10^3$   
 (361nm) =  $28.06 \times 10^3$   
 (278nm) =  $15.5 \times 10^3$  より

$$0.1879 / 28.06 \times 10^3 = 6.696 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$0.1046 / 15.5 \times 10^3 = 6.729 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$\text{AVE } 6.729 \times 10^{-4} \text{ M}$$

B12 (m.v. = 1355.4) より

$$6.729 \times 10^{-4} \times 1355.4$$

$$= 9098.1225 \times 10^{-4} \text{ g/l}$$

$$= 9.1 \mu\text{g/ml} \dots \textcircled{1} \quad \text{※ } 10 \mu\text{g/ml} \text{ と考える}$$

$$\textcircled{1} \quad 500 \mu\text{l} + 25\% \text{ EtOH } 4500 \mu\text{l} = 1 \mu\text{g/ml} \dots \textcircled{2}$$

$$\textcircled{2} \quad 50 \mu\text{l} + \text{超純水 } 950 \mu\text{l} = 50 \text{ng/ml} \dots \textcircled{3}$$

$$\textcircled{3} \quad 20 \mu\text{l} + \text{超純水 } 980 \mu\text{l} = 1 \text{ng/ml} \dots \textcircled{4}$$

$$\textcircled{4} \quad 500 \mu\text{l} + \text{超純水 } 4500 \mu\text{l} = 0.1 \text{ng/ml} \text{ 標準}$$

※実際は  $0.091 \text{ng/ml}$

ファイル名 : B-12

作成 : 16:38 03/08/07

データ : 利智 拓

測光値 : 吸光度

スキャン速度 : 高速

スリット幅 : 2.0

サンプリングピッチ : 0.5

図1. シアノコバラミン標準溶液の吸収スペクトルの一例

尿処理方法

尿	0.9ml
0.1M酢酸緩衝液(pH 4.8)	0.18ml
超純水	0.68ml
0.025% KCN	0.02ml

サンプルストックチューブ(2ml : BM)

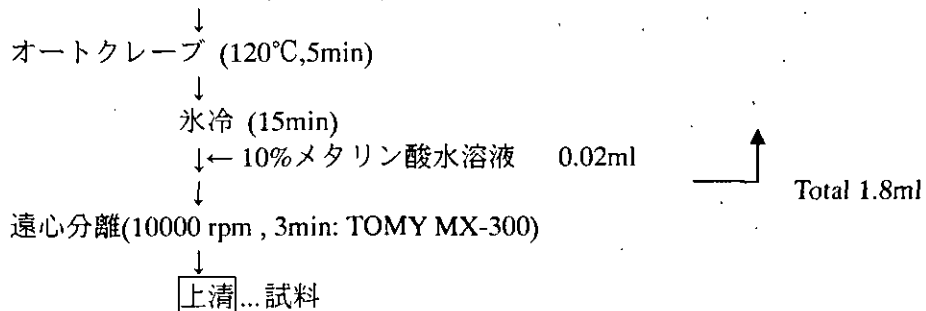


図2. 尿中のビタミン B<sub>12</sub> 定量用試料の作成方法

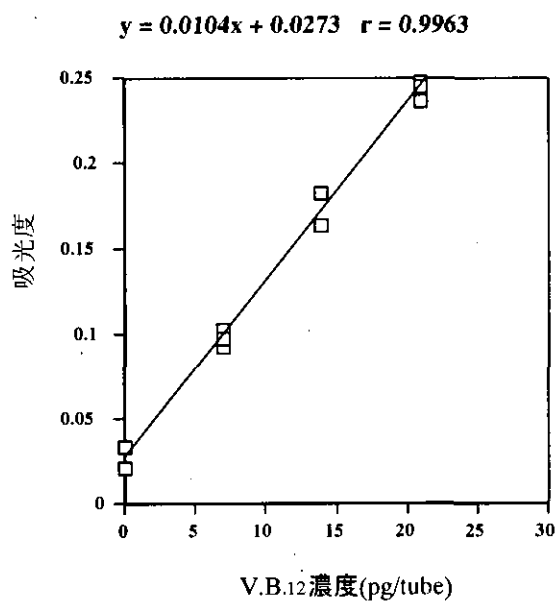


図3. ビタミン B<sub>12</sub> 定量のための検量線の一例

食品

↓ 超純水を加え，ミキサーで液状にし，重量 (a) を測定した。

食品ホモジネイト	0.5 g
0.57M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)	2.5ml
超純水	5ml
0.05% KCN	0.1ml

CENTRIFUGE TUBE (15ml :SUMILON)

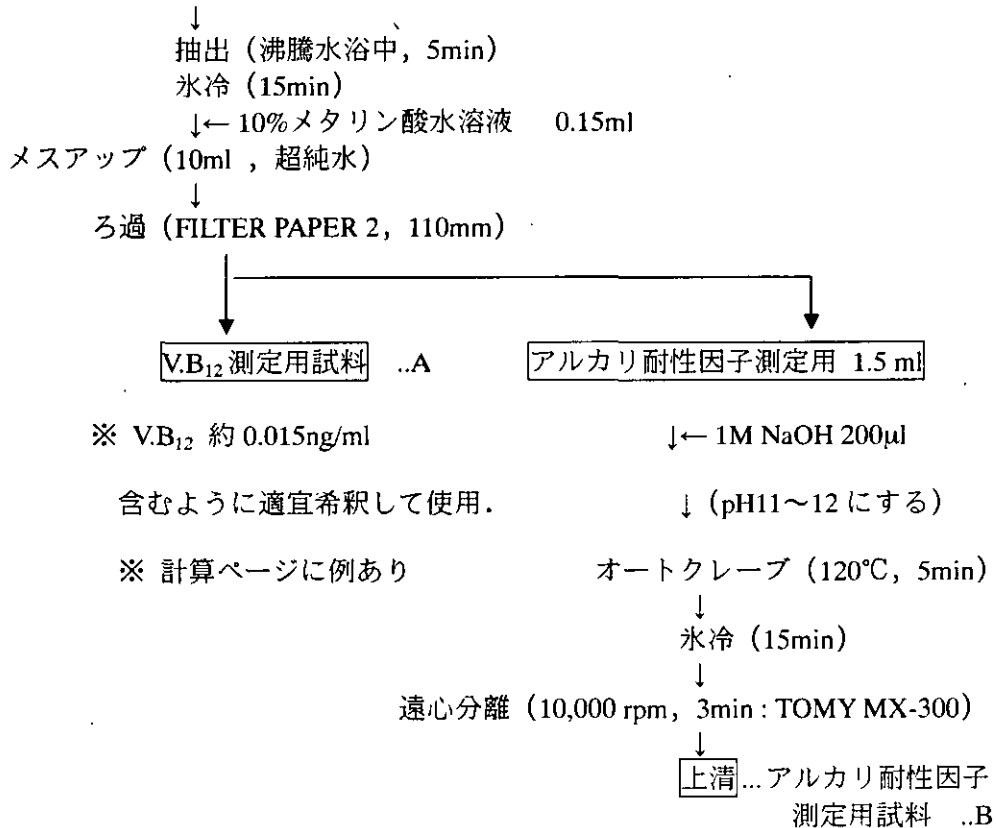


図4. 食品中のビタミン B<sub>12</sub> 定量用使用の作成方法

表1. ライヒマニ保存用培地の組成 (100ml 分)

酵母エキス	0.85g
ペプトン	0.85g
ブドウ糖	1.10g
リン酸二水素カリウム	0.20g
トマトジュース粉末	0.37g
ポリソルベート 80	0.10g

表2. ビタミン B<sub>12</sub> 定量用基礎培地 (基礎培地 2 倍濃度 1ml 中の量)

カザミノ酸	15mg	塩酸ピリドキシン	4 µg
L-シスチン	400µg	塩酸ピリドキサーール	4 µg
DL-トリプトファン	400µg	塩酸ピリドキサミン	800ng
硫酸アデニン	20µg	葉酸	200ng
塩酸グアニン	20µg	リン酸二水素カリウム	1 µg
ウラシル	20µg	リン酸一水素カリウム	1 mg
キサンチン	20µg	硫酸マグネシウム	400µg
塩酸チアミン	1 µg	硫酸第一鉄	20µg
リボフラビン	1 µg	硫酸マンガン	20µg
ビオチン	10ng	L-アスパラギン	200µg
ニコチン酸	2 µg	ブドウ糖	40mg
パラアミノ安息香酸	2 µg	酢酸ナトリウム (無水)	20mg
パントテン酸カルシウム	1 µg	アスコルビン酸	4mg

表3. ビタミン B<sub>12</sub> 定量操作方法

V.B <sub>12</sub> (pg/ tube)	0.1ng/ml V.B <sub>12</sub> 標準(μl)	超純水 (μl)	0. 1M KPB pH 6.2 (μl)	2 倍濃度定量用基 礎培地 (ml)	Total (ml)
0	-	800	200	1	2
5	50	750	↓	↓	↓
10	100	700	↓	↓	↓
15	150	650	↓	↓	↓
20	200	600	↓	↓	↓
30	300	500	↓	↓	↓
40	400	400	↓	↓	↓
ヒト 尿	400	400	↓	↓	↓
ラット 尿	50	750	↓	↓	↓
食品サンプル	100	600	400	↓	↓
アルカリ耐性	100	600	↓	↓	↓

## 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*<sup>1</sup>-methyl-2-pyridone-5-carboxamide), 尿中 4-Py (*N*<sup>1</sup>-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 μl 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, $\epsilon$ 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 μl インジェクションした.

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

標準のスペクトルを図 1 に示した.

##### 2-Py 標準 (凍結保存)

*N*<sup>1</sup>-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, $\epsilon$ 250nm = 14516 より

正確な濃度を求め, この液を標準とし, 20 μl インジェクションした.

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

標準のスペクトルを図 2 に示した.

##### 4-Py 標準 (凍結保存)

*N*<sup>1</sup>-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, $\epsilon$ 250 nm = 14516 より正確な濃度を求め, この液を標準とし, 20 μl インジェクションした.

##### 50mM KPB, pH 7.0

##### 1) 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (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 / cm<sup>2</sup>

カラム：CHEMCOSORB 7-ODS-L (φ4.6×250 mm)

カラム温度：40°C

検出器：SHIMADZU SPD-10AVP

データプロセッサー：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 (N<sup>1</sup>-methylnicotinamide: MNA) 測定方法

### 2-1. 試薬作成方法

#### MNA 標準 (冷蔵保存)

N<sup>1</sup>-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<sup>-4</sup> 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生するので, ドラフト内で水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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (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 / cm<sup>2</sup>

カラム：Tosoh ODS-80Ts (φ4.6×250 mm)

カラム温度：40°C

検出器：SHIMADZU RF-10AXF

データプロセッサー：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<sup>-4</sup> 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  
 $757722 / 33590 \times 3000 / 20 \times 25 / 0.1 \times 1 / 1000 =$   
 $846 \text{ nmol / day}$

### 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 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 3.0)	10ml
Ultra-pure water	990ml
Acetonitrile	41.7ml

流速：1.0 ml / min

PRESSURE：160kgf /  $\text{cm}^2$

カラム：CHEMCOSORB 7-ODS-L ( $\phi 4.6 \times 250$  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  $\mu\text{l}$ ), 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(%) =  $(C / B) \times 100$

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  $\times (500 / 20) \times (1.26 / 1.0) \times (9.8 / 1.2) \times (3.2 / 1.0) \times (1.0 / 0.6)$  (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

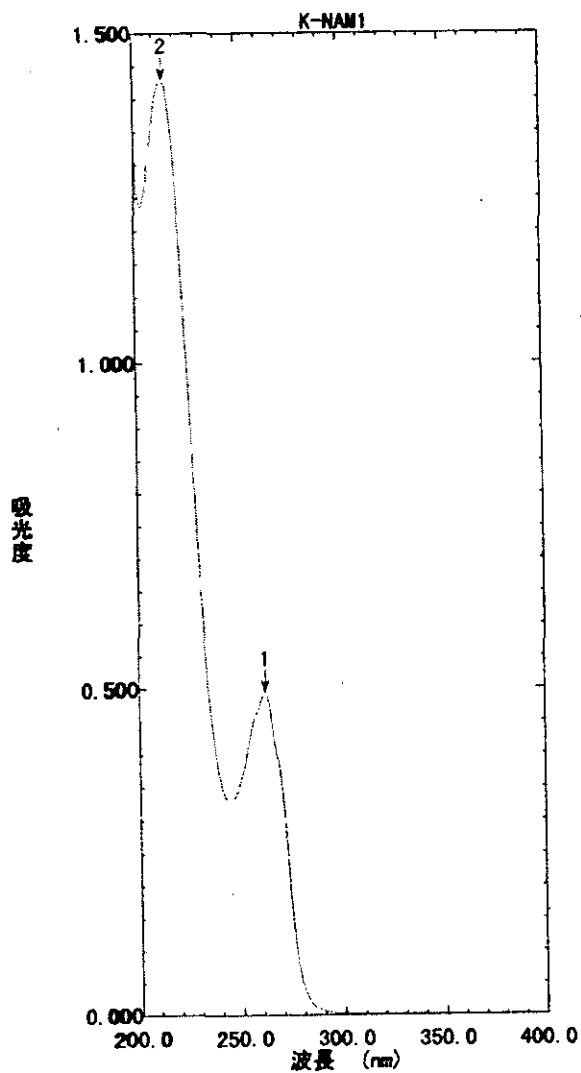
#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

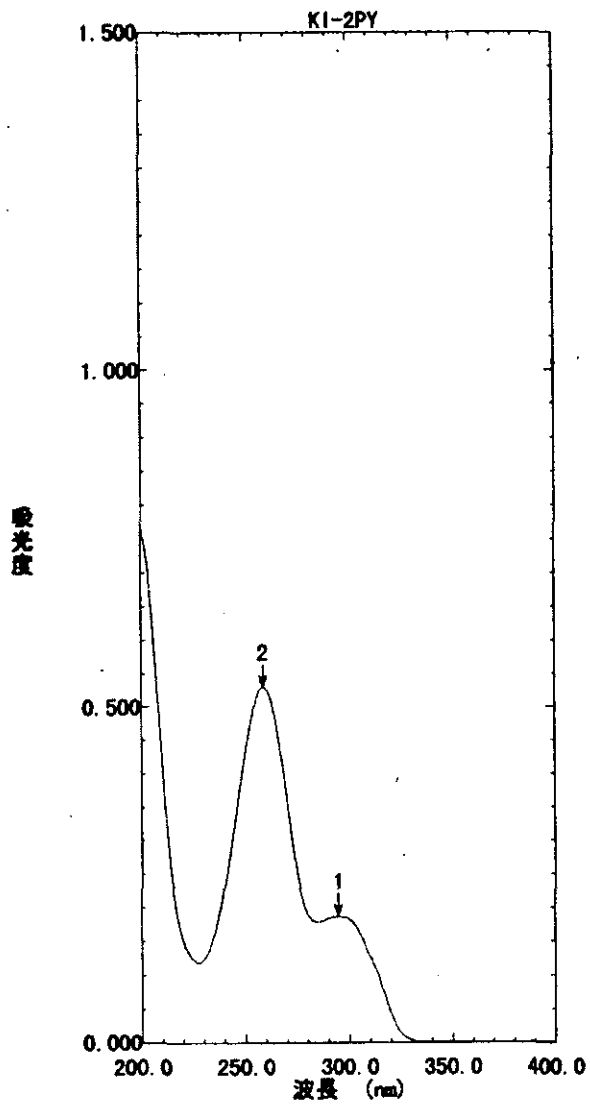




ピーク検出

番号	波長 (nm)	吸光度
1	262.00	0.4950
2	214.40	1.4294

図 1. ニコチンアミドの UV スペクトラム



ピーク検出

番号	波長 (nm)	吸光度
1	294.80	0.1867
2	258.60	0.5294

図 2.2-Py の UV スペクトラム

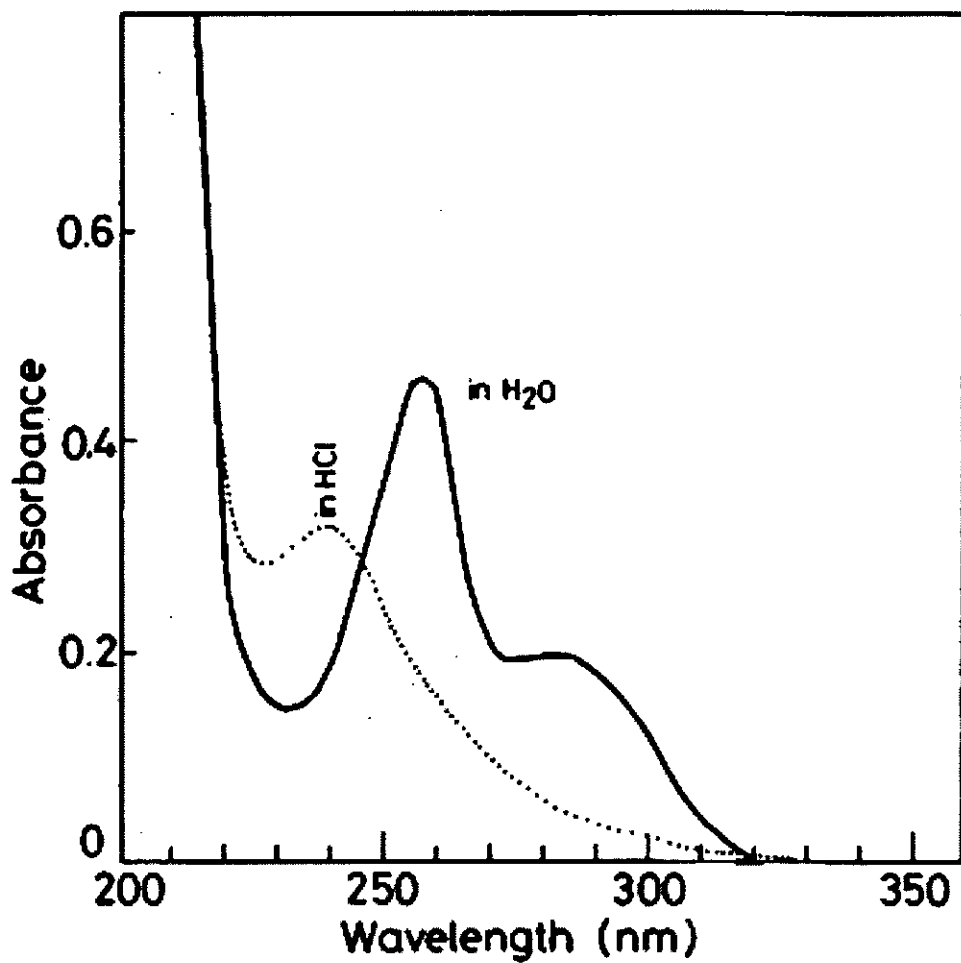


図 3. 4-Py の UV スペクトラム

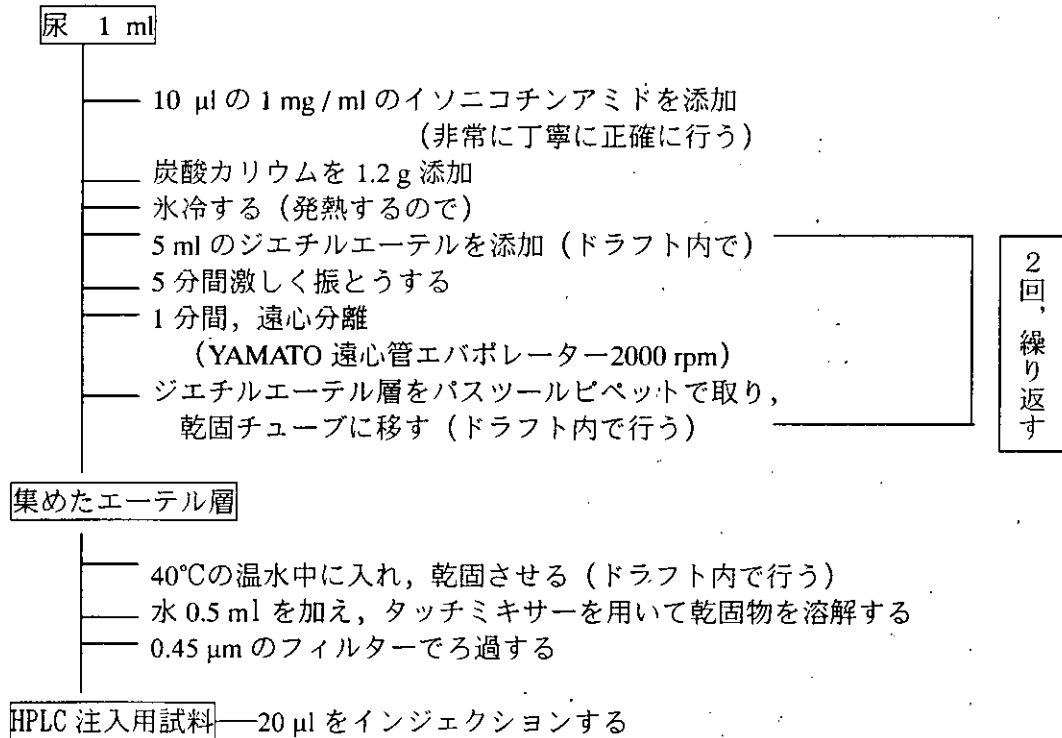


図 4. 尿を用いた時の HPLC 用試料の作成方法