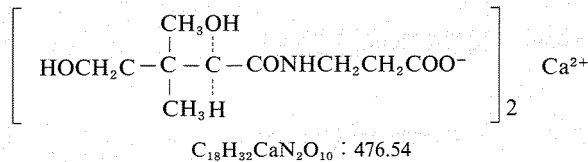


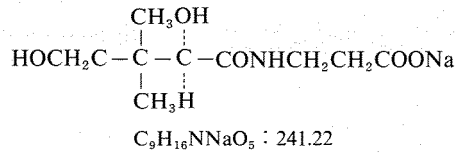
88 パントテン酸カルシウム及び パントテン酸ナトリウム

Calcium Pantothenate and Sodium Pantothenate

パントテン酸カルシウム



パントテン酸ナトリウム



1. 試験法の概要

食品中のパントテン酸カルシウム及びパントテン酸ナトリウムは、液体クロマトグラフィー（試験法 A）又は *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 を用いる微生物定量法（試験法 B）によりパントテン酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じてパントテン酸カルシウム又はパントテン酸ナトリウムの量として求める。

2. 試験法

試験法 A（液体クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2）試料液の調製

試料を細切し、その約 10g を精密に量り、水 60ml 及びシリコン樹脂 1 滴を加えて、5 分間ホモジナイズする¹⁾。これを遠心管に少量の水を用いて移し、0.1mol/l 塩酸で pH4~5 に調整する。次に硫酸亜鉛溶液（3→20）10ml を加えてよく混和し、遠心分離を行う。上澄液は

ろ紙でろ過し、ろ液は 100ml のメスフラスコに受ける。遠心管の残留物は少量の水で先のろ紙に流し込み、少量の水で洗い、洗液は先のメスフラスコに合わせる。水を加えて正確に 100ml とし、この液をメンブランフィルター（孔径 1.0 μ m）²⁾ でろ過し、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

デシケーター（五酸化リン）中で乾燥したパントテン酸カルシウム³⁾ 1.0918g を正確に量り、水を加えて溶かして正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、パントテン酸 1mg を含む）。標準液 1, 2, 4, 8ml 及び 12ml をそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれパントテン酸 10, 20, 40, 80 μ g 及び 120 μ g を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件

紫外分光光度計検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件で測定する。

カラム充てん剤：オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管：内径 6.2mm，長さ 250mm⁴⁾

移動相：アセトニトリル・リン酸一カリウム溶液の混液（1：9）⁵⁾，1ml/分⁵⁾

測定波長：200nm⁶⁾

② 検量線の作成

検量線用標準液 10 μ l⁷⁾ をそれぞれ正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さ又はピーク面積から検量線を作成する。

③ 定量

試料液 10 μ l を正確に量り、液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さ又はピーク面積と検量線から試料液中のパントテン酸濃度（ μ g/ml）を求め、次式によって試料中のパントテン酸含量（g/kg）を計算する。

$$\text{パントテン酸含量 (g/kg)} = \frac{C}{W \times 10}$$

C：試料液中のパントテン酸濃度（ μ g/ml）

W：試料の採取量（g）

パントテン酸カルシウム含量（g/kg）＝パントテン酸含量（g/kg） \times 1.087

パントテン酸ナトリウム含量（g/kg）＝パントテン酸含量（g/kg） \times 1.100

試薬・試液

1. アセトニトリル：[残留農薬試験用]

2. アセトニトリル・リン酸一カリウム溶液の混液 (1:9) : アセトニトリル1容量にリン酸一カリウム溶液9容量を加え、塩酸で pH3 に調整する。
3. シリコーン樹脂 : [食添]
4. 硫酸亜鉛 : [特級]
5. リン酸一カリウム : [特級]
6. リン酸一カリウム溶液 : リン酸一カリウム 2.72g に水を加えて溶かして 1,000ml とする (0.02mol/l)。

[注]

- 1) 粉碎と抽出を同時に行う。
- 2) 液体クロマトグラフのカラムに目詰まりがなければ必要としない。
- 3) USP の Reference Standard 又はこれに準ずるもの。
- 4) カラムの長さ、内径は自由を選ぶ。
- 5) 移動相組成比及び流速はカラムの状態等により一律に規制ができないため適宜変更し、パントテン酸の保持時間が 8~12 分になるように設定する。
- 6) 移動相でのパントテン酸の吸収極大が 194nm 近くにあるが、移動相の吸収もあるため、測定波長を 200nm とした。
- 7) 注入量は、検出感度、液体クロマトグラフの注入方式にも関係するので、3~20 μ l の一定量に変更できる。

試験法 B (微生物定量法)

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

粉碎した試料約 1g を精密に量り、30ml の水を加え、よく混和しながら 0.2mol/l 酢酸及び酢酸ナトリウム溶液 (1 → 50) を加えて pH を 5.6~5.7 に調整する¹⁾。次に、オートクレーブに入れ、1kg/cm² で約 5 分間²⁾ 加熱した後、冷却する。必要があれば、1mol/l 塩酸を加えて pH を 4.0~4.5 に調整した後、ろ過し、容器及び残留物を少量の水で洗い、ろ液及び洗液を合わせ、水を加えて正確に 50ml とする。この液 25ml を正確に量り、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 6.8 に調整し、水を加えて正確に 50ml にする。この液 10ml を正確に量り、溶液の 1ml がパントテン酸約 50ng 程度含むように水で希釈し、試料液とする。

(3) 標準液の調製

デシケーター（五酸化リン）中で乾燥させたパントテン酸カルシウム 54.4mg を正確に量り、1,000ml のメスフラスコに入れ、水約 500ml を加えて溶かす。この液に 0.2mol/l 酢酸 10ml、酢酸ナトリウム溶液（1→50）100ml を加え、水を加えて正確に 1,000ml とし、標準原液とする（この液 1ml は、パントテン酸 50 μ g を含む）。この液はトルエン少量を加えて冷所に保存する。

標準原液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、更にこの液 1ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、標準液とする（この液 1ml は、パントテン酸 50ng を含む）。

(4) 定量用培地の調製

カゼイン酸分解液³⁾ 10ml、シスチン・トリプトファン溶液 10ml、アデニン・グアニン・ウラシル溶液 2ml、ビタミン液 2ml、*p*-アミノ安息香酸・ニコチン酸・ビタミン B₆液 2ml、塩類溶液 A 2ml 及び塩類溶液 B 2ml を混和し、これにブドウ糖 4g 及び酢酸ナトリウム 2g を加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液（1→10）で pH を 6.8 に調整し、更に水を加えて全量を 100ml とし、定量用培地とする。必要があればろ過する。

(5) 接種菌液の調製

使用菌株として *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014⁴⁾ を用いる。保存されていた菌株保存用培地から増菌用培地 10ml に接種し、37°C で 16~24 時間培養する。培養後、菌浮遊液をよく振り混ぜた後、そのまま接種菌液⁵⁾ とする。

(6) 測定法

① 測定条件

分光光度計を用い、540~660nm の一定波長における吸光度を測定する。

② 測定

試料液 0.5、1.0ml 及び 1.5ml を 2 回ずつ正確に量り、2 系列の試験管 T (0.5~1.5)、T' (0.5~1.5) に入れ、それぞれに定量用培地 2ml 及び水を加えて正確に 4ml とし、よく混和する。

各試験管は綿栓をした後、1kg/cm² で 5 分間高圧蒸気滅菌し²⁾、冷却した後、各試験管に接種菌液 1 滴ずつを無菌的に接種し、37°C、20~24 時間ふ卵器⁶⁾ に入れて培養後、内容物をよく振り混ぜて試料測定液とする。水 2ml と定量用培地 2ml を合わせて正確に 4ml とし、接種せずに試料測定液と同様に操作した液を対照として波長 540~660nm の一定波長における試料測定液の吸光度 AT (0.5~1.5)、AT' (0.5~1.5) を測定する。

③ 検量線

標準液 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75ml 及び 2.0ml を 2 回ずつ正確に量り, 2 系列の試験管 S (0~2.0), S' (0~2.0) に入れ, ②測定と同様に操作し, 標準液による吸光度 AS_0 と AS'_0 , $AS_{0.25}$ と $AS'_{0.25}$, …… $AS_{2.0}$ と $AS'_{2.0}$ のそれぞれ平均値を求め, 濃度を横軸に, 吸光度を縦軸にとって検量線を作成する. ただし標準液による各吸光度が, 全体的比例曲線の値からみて $\pm 10\%$ 以上かけはなれている場合, この吸光度の数値は除外する.

④ 定量

検量線を用いて試料測定液による吸光度 $AT_{0.5}$, $AT'_{0.5}$, $AT_{1.0}$, $AT'_{1.0}$, $AT_{1.5}$, $AT'_{1.5}$ から, 6 本の試験管中のパントテン酸含量 (ng) を求め, 試料液 1ml 当たりの含量 (ng/ml) に換算してこの平均値を a とする.

ただし各含量値 (ng/ml) が, 平均値 a から $\pm 10\%$ 以上かけはなれているとき, その数値は計算から除外する. この除外した数値が 3 個以上ある場合は試験をやり直す. 次式によって検体中のパントテン酸含量 (g/kg) を計算する.

$$\text{パントテン酸含量 (g/kg)} = \frac{a \times b}{W \times 100,000}$$

a : 試料液 1ml 中のパントテン酸量 (ng/ml)

b : 試料液の量 (ml)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{パントテン酸カルシウム含量 (g/kg)} = \text{パントテン酸含量 (g/kg)} \times 1.087$$

$$\text{パントテン酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{パントテン酸含量 (g/kg)} \times 1.100$$

試薬・試液

1. アデニン・グアニン・ウラシル溶液: 硫酸アデニン, 塩酸グアニン及びウラシル各 0.1g を塩酸 (1 → 2) 5ml に加熱しながら溶かし, 冷後, 水を加えて 100ml とし, トルエン少量を加えて約 10°C で保存する.
2. p-アミノ安息香酸: [特級]
3. p-アミノ安息香酸・ニコチン酸・ビタミン B₆ 液: p-アミノ安息香酸 10.0mg, ニコチン酸 20.0mg 及びピリドキシン塩酸塩 40.0mg をエタノール溶液 (1 → 4) に溶かして全量を 1,000ml とし, 冷所に保存する.
4. ウラシル: 市販の特級品を用いる.
5. エタノール: [95v/v%, 特級]
6. 塩酸グアニン: 市販の特級品を用いる.
7. 塩酸チアミン: 市販の特級品を用いる.
8. 塩類溶液 A: リン酸一カリウム及びリン酸二カリウム各 5g を水に溶かして全量を 100ml

- とし、塩酸1滴及びトルエン少量を加えて保存する。
9. 塩類溶液 B：硫酸マグネシウム 2g, 塩化ナトリウム 0.1g, 硫酸第一鉄 0.1g 及び硫酸マンガ 0.1g を水に溶かして全量を 100ml とし、塩酸 1 滴及びトルエン少量を加えて保存する。
10. カゼイン：[食添] あらかじめパントテン酸を含有していないことを確かめる。
11. カゼイン酸分解液³⁾：カゼイン 100g をエタノールで 2 回洗浄し、5 倍量の塩酸 (1 → 2) を加え、還流冷却器を付けて 8~12 時間加熱する。この操作はオートクレーブ中、121~123°C で 8~12 時間加熱する操作でもよい。次に減圧下濃い糊状となるまで濃縮し、更に水 200ml を加えて同様濃縮する。残留物を水に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (1 → 10) で pH を 3.5 (±0.1) に調整し、水を加えて 1,000ml とする。次に活性炭 20g を加えてかき混ぜた後、ろ過する。ろ液が淡黄~無色となるまでこの操作を繰り返し、トルエン少量を加えて冷蔵庫に保存する。保存中、沈殿が生ずればろ過して用いる。
12. 寒天：市販品を用いる。
13. 菌株保存用培地及び保存方法：水 100ml に酵母エキス 2g を溶かし、ブドウ糖 0.5g, 酢酸ナトリウム 0.5g を加え、0.1mol/l 酢酸で pH を 6.8 に調整し、水浴上で 10~20 分間加熱し、ろ過後、寒天 1.5g を加え、加熱しながら溶かす。この液約 10ml ずつをあらかじめ綿栓をして乾熱滅菌⁷⁾を行った試験管に分注し、綿栓をして 1kg/cm² で 10 分間高压蒸気滅菌し、試験管を垂直にして冷却し、菌株保存用培地とする。 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 の保存菌株から菌株保存用培地に移植する。37°C で 16~24 時間培養し、冷所に保存する。保存菌株は毎週新たに調製し、1 週間を超したものは使用してはならない。
14. 酢酸ナトリウム：(無水) [特級]
15. L-シスチン：[特級]
16. シスチン・トリプトファン溶液：L-シスチン 2g 及び L-トリプトファン 0.5g を水 350~400ml に懸濁し、70~80°C に加熱し、固形物が溶けてしまうまで塩酸 (1 → 2) を加える。冷後、水を加えて全量を 500ml とし、トルエン少量を加えて約 10°C で保存する。
17. 増菌用培地：定量用培地 5ml 及びパントテン酸カルシウム溶液 5ml を、あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌⁷⁾を行った試験管に分注し、綿栓をし、1kg/cm² で 10 分間高压滅菌し、直ちに冷却し、冷所に保存する。
18. L-トリプトファン：[特級]
19. ニコチン酸：市販の特級品を用いる。
20. パントテン酸カルシウム溶液：パントテン酸カルシウム 4mg に水を加えて溶かして 1,000ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とする。
21. ビオチン：市販品を用いる。
22. ビタミン液：塩酸チアミン 1g, リボフラビン 2g 及びビオチン 4mg を 0.02mol/l 酢酸に

溶かして100mlとし、保存溶液とする。保存溶液1mlを採り、0.02mol/l酢酸を加えて1,000mlとする。この溶液はトルエン少量を加え、光を遮って冷所に保存する。

23. ピリドキシン塩酸塩：〔食添〕
24. ブドウ糖：〔特級〕
25. リボフラビン：市販品を用いる。
26. 硫酸アデニン：市販の特級品を用いる。
27. 硫酸マグネシウム：〔特級〕
28. 硫酸マンガン：〔特級〕
29. リン酸一カリウム：〔特級〕
30. リン酸二カリウム：〔特級〕

〔注〕

- 1) 分解を防ぐために、操作中の液のpHを常に7以下に保つ必要がある。
- 2) ビタミン定量用の基礎培地は、通常、半合成培地であり、天然培地と異なり不用意に長時間高圧蒸気滅菌処理を行うと、成分の一部が分解するおそれがあるので、定められた時間を守る必要がある。
- 3) 市販のビタミン不含カザミノ酸粉末1gを使用した方が簡便である。
- 4) その他のパントテン酸定量用菌株として、*L. casei* E ATCC 769, *L. fermenti* 36 ATCC 9338, *Str. faecalis* ATCC 8043, *Leuc. mesenteloides* P-60 ATCC 8042, *Pediococcus acidilactici* NCIB 6990等がある。
- 5) 通常接種菌液を調製するには、前培養した菌を滅菌生理食塩水で数回洗浄後、5~100倍に希釈して用いるが、少なくとも本法に限り結果に大差なく、上記の操作は不必要である。
- 6) 37℃で72時間培養した後、酸度滴定による定量を行ってもよい。
- 7) ガラス器具類の滅菌に使用し、160~170℃で30~60分間加熱する。ピペットや注射筒は硫酸紙で包み、金属製の缶に入れて滅菌するが、硫酸紙や綿栓がキツネ色に変色すれば滅菌は完全である。