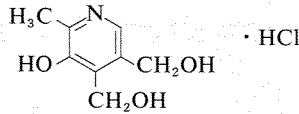


## 90 ピリドキシン塩酸塩

Pyridoxine Hydrochloride

別名：ビタミン B<sub>6</sub>



$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl : 205.64$

### 1. 試験法の概要

食品中のピリドキシンは *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 を用いる微生物定量法により、ピリドキシン塩酸塩として定量する。食品中にはピリドキシン、ピリドキサール、ピリドキサミンが分布している。したがって、定量値は食品由来のものと添加されたものとの合計値である。

### 2. 試験法（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

ピリドキシン塩酸塩として約  $5\mu\text{g}$  に対応する、通常、5g 以下の試料の量を精密に量り、0.055mol/l 塩酸 180ml を加え、オートクレーブ中  $121^\circ\text{C}$  で4時間加熱溶解する。冷却した後、1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH4.5~5.0<sup>1)</sup> に調整し、生じた沈殿をろ過し、残留物を水で洗浄し、洗液は先のろ液に合わせる。この液を 0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH5.0~5.2 に再調整し、水を加えて正確に 250ml とする。この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 50ml とし、試料液とする。

#### (3) 標準液の調製

ピリドキシン塩酸塩 0.100g を正確に量り、1mol/l 塩酸を加えて溶かして正確に 100ml とする。用時、この液 5ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とする。更に、この液 2ml を正確に量り、水を加えて正確に 1,000ml とし、標準液とする（この液 1ml は、ピリドキシン

塩酸塩 10ng を含む)。

#### (4) 定量用培地の調製

カゼイン酸分解液 10ml, ビタミン B<sub>1</sub> 溶液 5ml, イノシトール溶液 5ml, ビオチン溶液 2ml, パントテン酸カルシウム溶液 2.5ml, ニコチン酸溶液 0.5ml, 塩類溶液 50ml 及びクエン酸緩衝液 10ml を採り, 混和し, これにブドウ糖 10g を加えて溶かす。1mol/l 水酸化ナトリウム溶液で pH を 5.0~5.2 に調整し, 更に水を加えて 100ml とし, 必要があればろ過し, 定量用培地とする。

#### (5) 接種菌液の調製

使用菌株として *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 (ATCC 9080) を用いる。その純粋培養菌を用いて酵母用寒天斜面培地に接種し, 30℃ で 16~24 時間培養し, 冷所に保存して保存菌株をつくる。保存菌株は 2 週間ごとに新たに調製する。

保存菌株より菌体を採り, 滅菌生理食塩水を加え, 分光光度計を用い, 波長 600nm での透過率が 80~85% になるように滅菌生理食塩水で希釈し, 接種菌液とする。

#### (6) 測定法

##### ① 測定条件

分光光度計を用い, 波長 600nm における吸光度を測定する。

##### ② 測定

試料液 0.5, 1.0ml 及び 2.0ml をそれぞれ 2 回ずつ正確に量り, 2 系列の試験管 T (0.5~2.0), T' (0.5~2.0) に入れ, それぞれの試験管に定量用培地 2.5ml 及び水を加えて正確に 5ml とし, よく混和する。

各試験管に綿栓をした後, 121℃ で 5 分間高圧蒸気滅菌し, 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, 30℃ で 20~24 時間振とう培養する。培養後, 直ちに全試験管を同時に 121℃ で 5 分間高圧蒸気滅菌し, 試料測定液とする。

試料測定液につき, 水を対照として波長 600nm における吸光度 AT (0.5~2.0), AT' (0.5~2.0) を測定する。

##### ③ 検量線

標準液 0<sup>2)</sup>, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1.0ml 及び 1.5ml をそれぞれ 2 回ずつ正確に量り, 2 系列の試験管 S (0~1.5), S' (0~1.5) に入れ, ②測定と同様に操作し, 標準液による吸光度 AS<sub>0</sub> と AS'<sub>0</sub>, AS<sub>0.1</sub> と AS'<sub>0.1</sub>, …… AS<sub>1.5</sub> と AS'<sub>1.5</sub> 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 ±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<sup>3)</sup>による吸光度  $AT_{0.5}$ ,  $AT'_{0.5}$ ,  $AT_{1.0}$ ,  $AT'_{1.0}$ ,  $AT_{2.0}$ ,  $AT'_{2.0}$  から6本の試験管中のピリドキシン塩酸塩含量 (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  $c$  とする。

ただし各含量値 (ng/ml) が、平均値  $c$  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、試験はやり直す。次式によって検体中のピリドキシン塩酸塩含量 (g/kg) を計算する。

$$\text{ピリドキシン塩酸塩含量 (g/kg)} = \frac{c}{W \times 800}$$

$c$  : 試料液中のピリドキシン塩酸塩含量 (ng/ml)

$W$  : 試料の採取量 (g)

## 試薬・試液

1. イノシトール：[特級]
2. イノシトール溶液：イノシトール 100mg に水を加えて溶かして 100ml とする。
3. エタノール：[95v/v %, 特級]
4. 塩化カリウム：[特級]
5. 塩化カルシウム：[特級]
6. 塩化第二鉄：[特級]
7. 塩類溶液：リン酸一カリウム 2.2g, 塩化カリウム 1.7g, 塩化カルシウム 0.5g, 硫酸マグネシウム 0.5g, 硫酸マンガン 0.01g 及び塩化第二鉄 0.01g に水を加えて溶かして 1,000ml とする。トルエン 3 滴を加えて保存する。
8. カゼイン：[食添] あらかじめピリドキシンを含有していないことを確かめる。
9. カゼイン酸分解液：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、8~12 時間加熱する。この操作はオートクレーブ中、121~123℃で 8~12 時間加熱としてもよい。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 ( $\pm 0.1$ ) 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す。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。
10. 寒天：[日局]
11. クエン酸：[特級]
12. クエン酸カリウム：[特級]
13. クエン酸緩衝液：クエン酸カリウム 10g 及びクエン酸 2g に水を加えて溶かして 100ml

とする。

14. 酵母エキス：市販品を用いる。
15. 酵母用寒天斜面培地：寒天 20g, 酵母エキス 3g, 麦芽エキス 3g, ペプトン 5g 及びブドウ糖 10g に水を加えて溶かし, 必要があれば pH を 5.0~5.2 に調整し, 更に水を加えて 1,000ml とする。あらかじめ綿栓をして乾熱滅菌を行った試験管に 10ml ずつ分注し, 121°C で 5 分間高圧蒸気滅菌を行う。滅菌後直ちに冷却し (斜面とする), 冷所に保存する。
16. 生理食塩水：[日局]
17. チアミン塩酸塩：[食添]
18. ニコチン酸：[食添]
19. ニコチン酸溶液：ニコチン酸 100mg に水を加えて溶かして 100ml とする。
20. 麦芽エキス：市販品を用いる。
21. パントテン酸カルシウム：[食添]
22. パントテン酸カルシウム溶液：パントテン酸カルシウム 20mg に水を加えて溶かして 100ml とする。
23. D-ビオチン：市販品を用いる。
24. ビオチン溶液：D-ビオチン 25mg に水を加えて溶かして 1,000ml とした後, その 40ml を採り, 更に水を加えて 1,000ml とする。
25. ビタミン B<sub>1</sub> 溶液：チアミン塩酸塩 10mg に水を加えて溶かして 1,000ml とする。
26. ブドウ糖：[日局]
27. ペプトン：市販品を用いる。
28. 硫酸マグネシウム：[特級]
29. 硫酸マンガン：[特級]
30. リン酸一カリウム：[特級]

[注]

- 1) 粉乳等では沈殿を生じる場合が多いため, pH4.5~5.0 であらかじめ除タンパク操作をする。
- 2) 0 の場合でも菌が多少増殖する。この量が多いときは失敗であり, 再度検量線を作る。
- 3) 試料液 0.5, 1.0ml 及び 2.0ml と濃度に比例して菌が増殖するが, 検量線と比べ, 傾きが異なる場合 (±10%以上) は再度試料測定液を調製する。