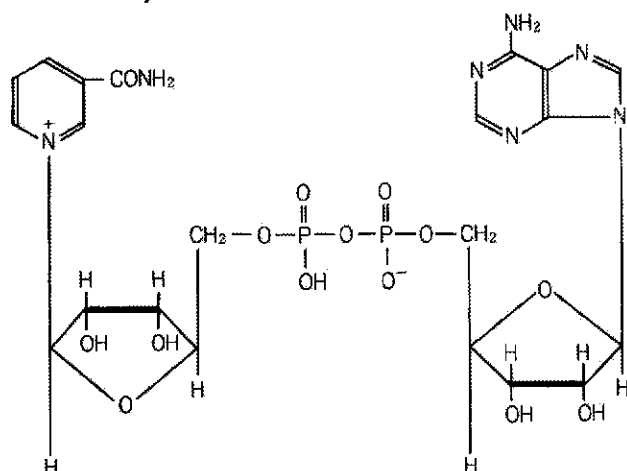


β - NAD⁺ (試薬) β -Nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ FW: 663.44

1. **適用範囲** この規格は、試薬として用いる β -NAD⁺ (β -ニコチンアミド-アデニン ジヌクレオチド) (以下、NAD という。) について規定する。

備考 この規格の引用規格を、次に示す。

JIS K 0068 化学製品の水分測定方法

JIS K 0117 赤外分光分析方法通則

JIS K 0124 高速液体クロマトグラフ分析のための通則

JIS K 8001 試薬試験方法通則

JIS K 8008 生化学試薬通則

JIS K 8101 エタノール (99.5) [エチルアルコール (99.5)] (試薬)

JIS K 8180 塩酸 (試薬)

JIS K 8355 酢酸 (試薬)

JIS K 8574 水酸化カリウム (試薬)

JIS K 8576 水酸化ナトリウム (試薬)

JIS K 8891 メタノール (試薬)

JIS K 9007 リン酸二水素カリウム (試薬)

JIS K 9704 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール [トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン] (試薬)

2. **共通事項** この規格に共通する事項は、JIS K 8001 及び JIS K 8008 による。

3. 性質

3.1 性状 NAD は、白色の結晶性の粉末で、においがなく、わずかに酸味がある。

また、NAD は、水に溶けやすく、エタノール、ジエチルエーテルには極めて溶けにくい。

3.2 確認試験 確認試験は、次のとおりとする。

(1) NAD 約 20mg を採り、りん酸緩衝液 (pH7.0, 25℃) 1l に溶かし、分光光度計を用いて極大吸収波長を測定し、その結果が $259 \pm 2\text{nm}$ であること。

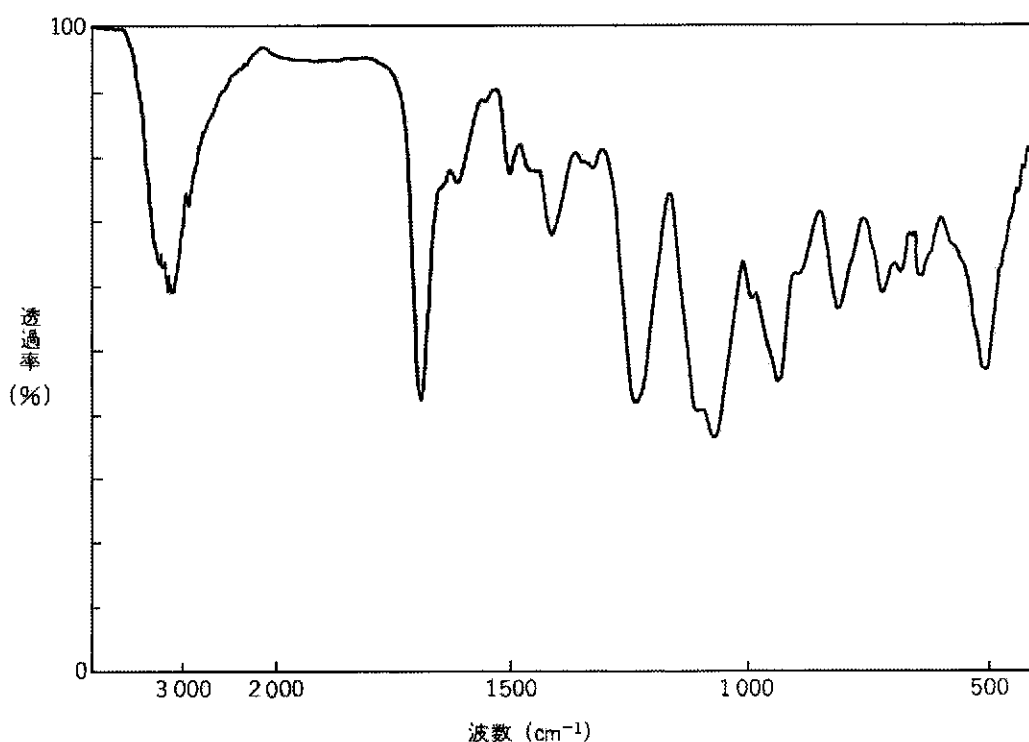
(2) NAD の水溶液 (約 1g/l) 0.2ml, エタノールートリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン水溶液 (pH8.7, 25℃) (1)4ml 及び酵母由来アルコール脱水素酵素液 (50IU/ml) (2)0.2ml を混和して、室温で 15 分間放置後、分光光度計を用いて極大吸収波長を測定し、その結果が $259 \pm 2\text{nm}$ と $339 \pm 2\text{nm}$ であること。

注(1) 5.1.1(1)のエタノールートリス溶液を用いる。

(2) 5.1.1(3)のアルコール脱水素酵素溶液を用いる。

(3) 試料 NAD の赤外吸収スペクトルを JIS K 0117 によって測定するとき、波数 1 690, 1 420, 1 230, 1 080, 940 及び 815cm^{-1} 付近に主な吸収を認める。この場合、試料調製は、JIS K 0117 の 6.2(1) (錠剤法) による。赤外吸収スペクトルの一例を図 1 に示す。

図 1 赤外吸収スペクトルの一例



4. 品質 品質は、5.によって試験し、表 1 に適合しなければならない。

表 1 品質

項目	品質
純度（無水塩として）	95%以上
モル吸光係数	
ϵ_{260}	$(18.0 \pm 0.5) \times 10^2 l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$
ϵ_{340}	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^2 l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$
吸光度比	
A250/A260	0.83 ± 0.03
A280/A260	0.21 ± 0.02
水分	8%以下
類似物質	5%未満
乳酸脱水素酵素インヒビター（相対活性）	98%以上

5. 試験方法

5.1 純度

5.1.1 試薬 試薬は、次のとおりとする。

(1) エタノールトリス溶液 JIS K 8101 に規定するエタノール 12ml と、JIS K 97041 に規定するトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 6.06g (0.05mol) に溶かして 500ml にする。

(2) リン酸緩衝液 (50mmol/l, pH7.0) JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 1.36g を水 150ml に溶かし、水酸化カリウム溶液 (2mol/l) (3)を用いて pH7.0 (25℃) に調整後、水で 200ml にする。

注(3) JIS K 8574に規定する水酸化カリウム13g に水を加えて100ml としたもの。

(3) アルコール脱水素酵素溶液 高純度酵母由来アルコール脱水素酵素（以下、ADH という。）の粉末又はその溶液を(2)のりん酸緩衝液で、50IU/ml になるように希釈調製(4)する。

注(4) 使用時に調製し、氷水中で保存し、0～4℃に保つ。

(4) 試料溶液 試料 NAD225±10mg をはかりとって水に溶かし、全量フラスコ 100ml に入れ、水を標線まで加える。これを試料溶液 a とする。

さらに、試料溶液 a から全量ピペットで正確に 5ml とり、全量フラスコ 25ml に入れ、水を標線まで加える。これを試料溶液 b とする。

なお、試料溶液は測定完了まで氷水中で保存し 0～4℃に保つ。

5.1.2 測定条件 分光光度計の測定条件は、次のとおりとする。

(1) 波長 340±0.3nm

(2) スペクトルバンド幅 2nm 以下

(3) 光路長 10mm

(4) 測定温度 25℃

5.1.3 測定方法 測定方法は、次のとおりとする。

(1) 試料溶液それぞれについて、表 2 によって各試料を全量ピペットを用いて各試験管に分注する。

表 2 反応条件

	試験管			
	A	B	C	D
水	0.2	0.5	0.7	1.0
エタノールトリス溶液	5.0	5.0	5.0	5.0
試料溶液 b	0.5	0.5	—	—
ADH 溶液	0.3	—	0.3	—

単位 ml

(2) 各試験管を十分かき混ぜて、室温で 15 分間放置する。

(3) 試験管 D を対照として 5.1.2 の測定条件で、試験管 A～C について、340nm における吸光度を測定する。

5.1.4 計算 純度は、次の式によって算出し、その平均値を求める。

$$\Delta A = A_{340} - (B_{340} + C_{340})$$

$$G = \frac{\Delta A \times 6.0 \times 663.44 \times 100}{0.5 \times (6.3 \times 10^2) \times 10 \times S} \times \frac{100}{(100 - W)}$$

ここに、

 A_{340} : 試験管 A の 340nm における吸光度 B_{340} : 試験管 B の 340nm における吸光度 C_{340} : 試験管 C の 340nm における吸光度 G : 純度 (%)

0.5 : 試料 b 溶液の液量 (ml)

 6.3×10^2 : 340nm における NADH のモル吸光係数 ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$)

10 : 光路長 (mm)

 S : 試料溶液 b 中の NAD 濃度 (mg/ml)

6.0 : 試験管内の総液量 (ml)

663.44 : NAD の式量

 W : 5.4 で求めた水分 (%)

5.2 モル吸光係数

5.2.1 260nm におけるモル吸光係数

5.2.1.1 試薬 試薬は、次のとおりとする。

(1) トリス-塩酸緩衝液 (100mmol/l, pH7.5) トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 6.06g を水 400ml に溶解し、塩酸 (6mol/l) (5) を用いて pH7.5 (25℃) に調整後、水で 500ml にする。

注(6) JIS K 8180に規定する塩酸54ml に水を加えて100ml としたもの。

(2) 試料溶液 5.1.1(4)の試料溶液 b による。

5.2.1.2 測定条件 分光光度計の測定条件は、次のとおりとする。

(1) 波長 $250 \pm 0.3\text{nm}$ (6), $260 \pm 0.3\text{nm}$ 及び $280 \pm 0.3\text{nm}$ (6)

注(6) 5.3において必要となる。

(2) スペクトルバンド幅 2nm 以下

(3) 光路長 10mm

(4) 測定温度 25℃

5.2.1.3 測定 測定は、次のとおりとする。

(1) 試料溶液それぞれについて、表 3 によって各試料を全量ピペットを用いて各試験管に分注する。

表 3 反応条件

	単位 ml	
	試験管	
	E	F
トリス-塩酸緩衝液 (100mmol/l, pH7.5)	5.0	5.0
試料溶液 b	0.5	—
水	—	0.5

(2) 各試験管を十分かき混ぜる。

(3) 試験管 F を対照として 5.2.1.2 の測定条件で、試験管 E の 260nm における吸光度を測定する。

5.2.1.4 計算 5.2.1.3 の(3)で得られた測定値について、260nm におけるモル吸光係数を次の式によって算出し、その平均値を求める。

$$\epsilon_{260} = \frac{E_{260} \times 5.5 \times 663.44}{0.5 \times S} \times \frac{100}{(100 - W)}$$

ここに、
 ϵ_{260} : 260nm におけるモル吸光係数 ($\times 10^2 l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$)
 0.5 : 試料溶液 b の液量 (ml)
 S : 試料溶液 b 中の NAD 濃度 (mg/ml)
 E_{260} : 試験管 E の 260nm における吸光度
 5.5 : 試験管内の総液量 (ml)
 663.44 : NAD の式量
 W : 5.4 で求めた水分 (%)

5.2.2 340nm におけるモル吸光係数 5.1 で得られた測定値について、ADH による還元反応後の 340nm におけるモル吸光係数を次の式によって算出し、その平均値を求める。

$$\epsilon_{340} = \frac{(A_{340} - C_{340}) \times 6.0 \times 663.44}{0.5 \times 10 \times S} \times \frac{100}{(100 - W)}$$

ここに、
 ϵ_{340} : 340nm におけるモル吸光係数 ($\times 10^2 l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$)
 0.5 : 試料溶液 b の液量 (ml)
 10 : 光路長 (mm)
 S : 試料溶液 b 中の NAD 濃度 (mg/ml)
 A_{340} : 試験管 A の 340nm における吸光度
 C_{340} : 試験管 C の 340nm における吸光度
 6.0 : 試験管内の総液量 (ml)
 663.44 : NAD の式量
 W : 5.4 で求めた水分 (%)

5.3 吸光度比 5.2.1.3 と同様の方法によって、試験管 E の 250nm 及び 280nm における吸光度を測定し、吸光度比を次の式によって算出する。

$$A_{250}/A_{260} = \frac{E_{250}}{E_{260}}$$

$$A_{280}/A_{260} = \frac{E_{280}}{E_{260}}$$

ここに、
 E_{250} : 試験管 E の 250nm における吸光度
 E_{280} : 試験管 E の 280nm における吸光度

5.4 水分 試料約 30mg を用いて JIS K 0068 の 4. (カールフィッシャー滴定法) で求める。

5.5 類似物質

5.5.1 試薬 試薬は、次のとおりとする。

(1) **試料** NAD 約 10mg をとり、水 10ml に溶かす。

(2) 酢酸ナトリウム緩衝液 (0.5mol/l, pH5.5) JIS K 8355 に規定する酢酸 30g を水 800ml に入れ、水酸化ナトリウム溶液 (6mol/l) (7)を用いて pH5.5 (25℃) に調整後、水で 1l にする。

注(7) JIS K 8576に規定する水酸化ナトリウム25g に水を加えて100ml としたもの。

(3) 酢酸ナトリウム緩衝液 (50mmol/l, pH5.5) (2)の酢酸ナトリウム緩衝液 (0.5mol/l, pH5.5) 100ml を水で 1l にする。

(4) メタノール酢酸ナトリウム緩衝液 (50mmol/l, pH5.5) (2)の酢酸ナトリウム緩衝液 (0.5mol/l, pH5.5) 100ml と JIS K 8891 に規定するメタノール 750ml を混合し、水で 1l にする。

5.5.2 装置 装置は、次のとおりとする。

(1) 装置 高速液体クロマトグラフ。

(1.1) 検出器 波長 260nm で測定可能な紫外吸光検出器。

(1.2) カラム用管 ステンレス鋼製など。

(1.3) グラジエント装置

(1.4) 記録計 記録紙送り速度 5mm/min 可能なもの。

(1.5) データ処理装置

5.5.3 測定方法 測定方法は、次のとおりとする。

(1) 一般事項 JIS K 0124 による。

(2) 分析条件の設定 分析条件は機器によって異なるので、各機器についての最適条件で行わなければならない。次に、その一例を示す。

(2.1) カラム用管 ステンレス鋼製、内径 4.6mm、長さ 250mm。

(2.2) カラム充てん剤 化学結合型シリカゲル、粒径 5 μ m。

参考 TSKGel, ODS120T などがある。

(2.3) カラム槽温度 室温

(2.4) 溶離液 5.5.1(3)及び(4)を用い、表 4 による。

表 4 溶離液の組成

時間 (min)	溶離液 (全体で 100%)	
	A ポンプ (%)	B ポンプ (%)
0	100	0
30	65	35
35	65	35
36	0	100
45	0	100
46	100	0
60	100	0

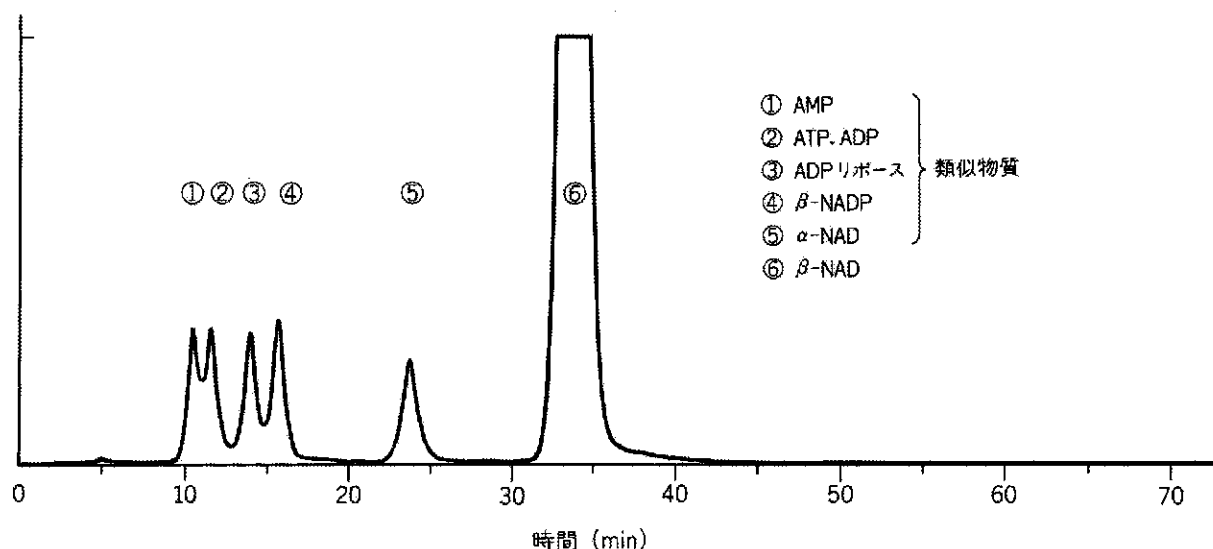
(2.5) 流速 0.7ml/min

(2.6) 試料導入力 100 μ l

(2.7) 記録紙送り速度 5mm/min

(3) クロマトグラムの一例 (2)の分析条件で行ったクロマトグラムの一例を図 2 に示す。

図2 クロマトグラムの一例



5.5.4 計算 JIS K 0124 の 8.3.(1) (半値幅法) 又は 8.7 (データ処理装置を用いる方法) によって, 260nm における各ピークの面積の総和に対する NAD のピーク以外のピークの面積の総和の割合 (%) を求める。

5.6 乳酸脱水素酵素インヒビター

5.6.1 試薬 試薬は, 次のとおりとする。

- (1) **トリス-塩酸緩衝液 (100mmol/l, pH8.5)** トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 12.1g を水 900ml に溶解し, 塩酸 (6mol/l) を用いて pH8.5 (30℃) に調整後, 水で 1l にする。使用時には, 30℃にする。
- (2) **トリス溶液 (150mmol/l)** トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 1.82g を水に溶かして, 100ml にする。
- (3) **りん酸緩衝液** JIS K 9007 に規定するりん酸二水素カリウム 13.6g を水 800ml に溶解し, 水酸化カリウム溶液 (6mol/l) を用いて pH7.0 (30℃) に調整後, 高純度牛血清アルブミン 5g を溶かし, 水で 1l にする。
- (4) **試料溶液 (80mmol/l)** 試料 NAD (無水塩として 265mg) を(2)のトリス溶液 (150mmol/l) 5ml に溶かす。
- (5) **標準 NAD 溶液 (80mmol/l)** 高純度 NAD 標準品 (無水塩として 48.5mg) を(2)のトリス溶液 (150mmol/l) 5ml に溶かす。
- (6) **乳酸脱水素酵素溶液** うさぎ筋肉由来乳酸脱水素酵素 (以下, LDH という。) を酵素たん白質濃度が 15μg/ml になるように(3)のりん酸緩衝液で溶かすか, 又は希釈する。試料溶液は, 測定完了まで氷水中に保存し 0~4℃に保つ。
- (7) **乳酸リチウム溶液 (40mmol/l)** L-乳酸リチウム 384mg を(1) トリス-塩酸緩衝液 100ml に溶かす。使用時には正確に 30℃にする。

5.6.2 装置 温度調節器付きの分光光度計を用いる。

5.6.3 測定条件 分光光度計の測定条件は, 次のとおりとする。

- (1) **温度** 30±1℃
- (2) **波長** 340±0.3nm
- (3) **スペクトルバンド幅** 2nm 以下

(4) 光路長 10mm

5.6.4 測定 測定は、次のとおりとする。

(1) 次の各試薬を吸収セルに入れる。

5.6.1(1)のトリス-塩酸緩衝液 0.90ml

5.6.1(4)の試料溶液又は 5.6.1(5)の標準 NAD 溶液 0.30ml

5.6.1(6)の LDH 溶液 0.02ml

(2) 混和後、吸収セルを分光光度計にセットし、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、5 分間放置する。

(3) 5.6.1(7)の乳酸リチウム溶液 1.2ml を吸収セルに入れ、よく混和する。

(4) 反応を $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で少なくとも 1 分間行う。

(5) (4)の結果から、1 分間当たりの吸光度の変化量を求める。

5.6.5 計算 LDH インヒビターは、次の式によって、相対活性として算出する。

$$R = \frac{\Delta A_s}{\Delta A_c} \times 100$$

ここに、 R ： 相対活性 (%)

ΔA_c ： 標準 NAD 溶液を用いたときの 1 分間当たりの吸光度変化量

ΔA_s ： 試料溶液を用いたときの 1 分間当たりの吸光度変化量

6. 容器 遮光できる密栓型容器とする。

7. 貯蔵方法 5°C 以下で、暗所に保存^(*)する。長期の保存は、 -20°C 以下で行うことが望ましい。

注^(*) 吸湿すると、純度が低下する。

8. 表示 表示は、次のとおりとする。

(1) 名称 “ β -NAD⁺” 及び “試薬” の文字

(2) 英文名称

(3) 化学式

(4) 式量

(5) 品質 (実測値)

(6) 内容量

(7) 製造年月又はその略号

(8) 製造番号

(9) 製造業者名又は販売業者名

(10) 保存方法

JIS K 9802 原案作成委員会 構成表

	氏名	所属
(委員長)	奥山典生	東京都立大学理学部
	増田優	通商産業省基礎産業局
	細川幹夫	工業技術院標準部
	桑克彦	筑波大学医療技術短期大学部
	田中秀興	微生物工業技術研究所細胞機能部機能制御研究室
	西末雄	化学技術研究所化学標準部
	鈴木正信	通商産業検査所化学部
	大野忠夫	理化学研究所ジーンバンク細胞銀行
	栗原力	財団法人化学品検査協会東京事業所
	坂田衛	財団法人日本分析機器工業会
	三木敬三郎	東燃株式会社総合研究所基礎研究所
	角田勝	三菱化成株式会社ライフサイエンス室
	桜井正二	味の素株式会社アミノ酸部
	河崎忠好	ファルマシア株式会社バイオテクノロジーモレキュラー センター
	堀尾武一	オリエンタル酵母工業株式会社長浜生物化学研究所
	藤島鉄郎	ヤマサ醤油株式会社研究開発本部特許情報室
	竹内幸夫	和光純薬工業株式会社
	木幡守	協和発酵工業株式会社研究開発本部

第1分科会 構成表

	氏名	所属
(分科会長)	桜井正二	味の素株式会社アミノ酸部
	鈴木貞夫	田辺製薬株式会社分析化学研究所事業部
	宗像豊尅	協和発酵工業株式会社生産計画センター
	松岡学	日本理化学薬品株式会社研究開発本部
	北島尚	第一化学薬品株式会社化学薬品事業部

第2分科会 構成表

	氏名	所属
(分科会長)	河崎忠好	ファルマシア株式会社バイオテクノロジーモレキュラー センター
	平岡信次	宝酒造株式会社中央研究所バイオプロダクツセンター
	前川宜彦	東洋紡績株式会社生化学事業部
	倉橋嘉治	コスモバイオ株式会社営業一部

第3分科会 構成表

	氏名	所属
(分科会長)	桑克彦	筑波大学医療技術短期大学部
	藤田剛	オリエンタル酵母工業株式会社生化学開発センター製 品開発室
	宗像豊尅	協和発酵工業株式会社生産計画センター
	友松保幸	関東化学株式会社試薬事業本部学術部

第 4 分科会 構成表

	氏名	所属
(分科会長)	藤 島 鉄 郎	ヤマサ醤油株式会社研究開発本部特許情報室
	宗 像 豊 尅	協和発酵工業株式会社生産計画センター
	斉 藤 幹 彦	株式会社同仁化学研究所技術部

第 5 分科会 構成表

	氏名	所属
(分科会長)	竹 内 幸 夫	和光純薬工業株式会社
	井 上 肇	ナカライテクス株式会社
	斉 藤 幹 彦	株式会社同仁化学研究所技術部
	高 野 眞美子	東京化成工業株式会社検査部
	飯 島 弘 淳	財団法人化学品検査協会化学標準部