

家蚕体内维生素 B₆ 的存在形态和转换代谢

张剑韵, 黄龙全

(安徽农业大学蚕业丝绸系, 合肥 230036)

摘要: 采用不含桑叶粉末、以去维生素牛乳酪蛋白为蛋白源的准合成饲料饲养家蚕 *Bombyx mori* 幼虫, 探讨了家蚕体内维生素 B₆ (VB₆) 化合物的存在形态和转换代谢途径。随饲料中盐酸吡哆醇 (PN-HCl) 添加量的增加, 幼虫体内吡哆醇 (PN) 含量相应变化, 其次是吡哆醛 (PL); 而辅酶型磷酸吡哆醛 (PLP) 和磷酸吡哆胺 (PMP) 含量存在稳定性。饲料中的吡哆醇以单纯扩散的形式进入体液; 体液中的吡哆醇被各种组织吸收后, 在各自的吡哆醛激酶和 PNP/磷酸吡哆胺氧化酶的作用下, 转变成辅酶型磷酸吡哆醛。家蚕不同于哺乳动物, 没有特定的辅酶型磷酸吡哆醛形成组织和辅酶型磷酸吡哆醛的转送机制。同时家蚕体内缺乏具储存 VB₆ 功能的辅酶型磷酸吡哆醛结合蛋白, 推测这是用缺乏 VB₆ 的饲料饲养各龄起蚕, 幼虫当龄死亡的主要原因。

关键词: 家蚕; 准合成饲料; 维生素 B₆; 存在形态; 转换代谢

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2003) 03-0277-05

Distribution, movement and metabolism of vitamin B₆ compounds in the silkworm, *Bombyx mori*

ZHANG Jian-Yun, HUANG Long-Quan (Department of Sericulture and Silk, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The distribution, movement and metabolism of vitamin B₆ (VB₆) compounds in the silkworm, *Bombyx mori*, were studied in larvae reared on a semisynthetic diet, in which there was no mulberry powder and vitamin-free casein was the protein source. With the increase in the pyridoxine hydrochloride (PN-HCl) content of the diet, pyridoxine (PN) accumulated, and the content of pyridoxal (PL) increased in the larval body. However, the contents of (PLP) and pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), both of which are the coenzyme forms of VB₆, remained almost constant. PN absorbed by the midgut was first diffused into the hemolymph and then distributed to other organs by active transport. PN was first phosphorylated to pyridoxine 5'-phosphate (PNP) by PL kinase, which was then oxidized to PLP by PNP/PMP oxidase in every larval organ except hemolymph. The transportation system of PLP, in which PLP binds to albumin, in the mammalian blood does not exist in silkworms. It is thus thought that the distribution, movement and metabolism of VB₆ compounds are different from those of mammals, and these are the reasons why almost no larvae could reach the next instar when newly molted larvae were reared on a VB₆-deficient diet.

Key words: *Bombyx mori*; semisynthetic diet; vitamin B₆; distribution; metabolism

维生素 B₆ (VB₆) 是一类 2-甲基-3-羟基吡啶类化合物的总称。游离型有吡哆醇 (pyridoxine, PN)、吡哆醛 (pyridoxal, PL) 和吡哆胺 (pyridoxamine, PM); 辅酶型为磷酸吡哆醛 (pyridoxine 5'-phosphate, PLP) 或磷酸吡哆胺 (pyridoxamine 5'-phosphate, PMP)。关于动物体内 VB₆ 化合物的吸收和转换代谢, 已经发现磷酸酯型 VB₆ 受肠道内非特

异性磷酸酶的水解作用转变为游离型; 进入体内的吡哆醇、吡哆胺和吡哆醛在同一种吡哆醛激酶的作用下, 转变为相应的磷酸吡哆醇 (PNP)、磷酸吡哆胺和磷酸吡哆醛 (McCormick *et al.*, 1961); 磷酸吡哆醇和磷酸吡哆胺在黄素单核苷酸 (FMN) 要求性氧化酶的作用下转变成磷酸吡哆醛 (Kazarinoff and McCormick, 1975; Merrill *et al.*, 1979); 磷酸吡

哆醛和磷酸吡哆胺通过转氨作用相互转换；没有与蛋白质结合的磷酸脂型 VB_6 易受磷酸酶的水解作用成为游离型 (Turner, 1961)；而排泄型 VB_6 为没有生理活性的吡哆酸 (PIC)，由吡哆醛在肝脏受黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 要求性醛氧化酶或醛脱氢酶的作用生成，经肾脏、尿道排出体外 (Morino *et al.*, 1960, Stanulovic *et al.*, 1976)。肝脏是 VB_6 的转换代谢中心，其它组织主要由肝脏通过血液以磷酸吡哆醛和吡哆醛的形式提供 VB_6 。当人大量服用盐酸吡哆醇 (PN-HCl) 后，血液中磷酸吡哆醛增加 5 倍，吡哆醛增加 8 倍，吡哆酸增加 4.5 倍，而吡哆醇和吡哆胺几乎不增加 (Lumeng and Li, 1978)。血液中磷酸吡哆醛的大部分与血清蛋白相结合，这样可以免受血液中磷酸酶的水解作用，被称为 VB_6 的转送型和储存型 (Lumeng *et al.*, 1974)。

除上述的转换路径外，兔的肝脏和酵母中存在能够直接将吡哆醇氧化成吡哆醛的酶 (Tani, 1980)；在一些微生物中还发现磷酸酶的逆催化作用能够将吡哆醛等转变成相应的磷酸脂型 (Tani *et al.*, 1968)。

我们采用不含桑叶粉末，以去维生素牛乳酪蛋白为蛋白源的准合成饲料饲育家蚕幼虫，采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 技术检测 VB_6 化合物，首次系统探讨了家蚕体内维生素 B_6 的存在形态和转换代谢途径。结果表明昆虫和哺乳动物存在很大的差异。

1 材料和方法

1.1 蚕品种、饲育方法和试验饲料组成

蚕品种为春岭 × 钟月。1~4 龄为普通人工饲料无菌条件下饲育。5 龄起蚕开始，在 255 mm × 350 mm × 60 mm 的塑料盒中分别放入 50 头幼虫作为一个试验区，用试验饲料在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的无菌条件下饲育。

试验饲料组成：去维生素酪蛋白 30 g，纤维素粉末 30 g，淀粉 15 g，蔗糖 10 g，琼脂 5 g，混合无机盐 4.5 g，大豆油 3 g，维生素 C 2 g，柠檬酸 2 g， β -谷甾醇 0.5 g，山梨酸 0.3 g，桑色素 0.2 g，氯霉素 0.1 g， VB_6 以外的 B 群维生素混合物 0.43 g。合成盐酸吡哆醇 (PN-HCl) 的添加量为每克粉体饲料 0、30 和 150 μg 。按每克粉体饲料 2.3 mL 的比例添

加蒸馏水，充分搅拌后蒸煮 30 min。经再度搅拌，室温下放冷后冰箱中冷藏保存。

1.2 VB_6 化合物的高效液相色谱分离和荧光定量

VB_6 化合物的高效液相色谱分离和荧光定量测定方法参照 Tsuge 和 Hirose (1989)。抽取各饲料区幼虫，剪尾角取体液；蚕体在冰浴中解剖，各种幼虫组织用生理盐水洗净，滤纸吸去表面水分后称重；合并 3~5 头幼虫组织作为一个样本。

取体液 1 mL，加 3 mol/L HClO_4 0.5 mL，经离心 (15 000 r/min, 0°C) 10 min 去蛋白。上清液移入试管中，加 1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 5.5) 0.5 mL，用 500 g/L KOH 调整 pH 为 3.5，定容 5 mL 后再度离心去盐。所得上清液经孔径 0.45 μm 的过滤器过滤后供 HPLC 分析。其它组织按鲜重 3 倍量的比例加 1 mol/L HClO_4 ，冰浴中破碎匀浆。离心去蛋白后取 1 mL，加 1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 5.5) 0.5 mL，其它操作与体液相同。

磷酸吡哆醛的荧光特性不同于其它 VB_6 化合物，经转变为磷酸吡哆酸 (PIC-P) 后定量分析。取上述 HClO_4 抽出液 1 mL，用 5 mol/L KOH 调整 pH 为 7.5，加 0.1 mol/L KCN 50 μL ，立即振动搅拌 1 min， 50°C 条件下反应 3 h。恢复室温后，用 1 mol/L HCl 调整 pH 为 3.5，室温下放置一昼夜。定容 2 mL，经过滤后供 HPLC 分析。 VB_6 化合物对光照敏感。为避免光分解，以上操作均在暗室中进行。

分析装置采用 Tosoh 全自动 HPLC 分析系统，由 SC-8020 控制器、AS-8020 自动进样器、CCPM-II 循环泵、CO-8020 恒温槽和 FS-8020 荧光检测器构成。分离柱为 Tosoh TSK gel ODS-120A (250 mm × 4.6 mm I. D.)，保持温度 30°C 。移动相为 1% CH_3CN 、0.1 mol/L KH_2PO_4 、0.1 mol/L NaClO_4 (pH 3.5)，流速 0.5 mL/min。荧光检测器调整激发波长 305 nm，荧光波长 390 nm，KCN 处理后改为 320 nm 和 420 nm。进样量均为 50 μL 。标准 VB_6 化合物为日本半井株式会社产品。在所述分析装置和分析条件下的溶出时间 (min) 分别为：磷酸吡哆胺 6.68、吡哆胺 9.20、磷酸吡哆醇 11.6、磷酸吡哆醛 (KCN 处理后) 13.2、吡哆醛 18.6、吡哆醇 25.7 和吡哆酸 32.03。在相同的条件下，用峰面积制作标准回归线，算出样品中 VB_6 化合物的含量。

1.3 VB_6 化合物转换代谢酶的检索分析

各种幼虫组织按鲜重 4 倍量的比例加 5 mmol/L 三乙醇胺 (TEA) 缓冲液 (pH 7.0)，冰浴中破碎

匀浆, 经 15 min 离心 (15 000 r/min, 4℃) 后, 上清液为粗酶液。体液加入等量的 TEA 缓冲液, 经超声波破碎处理 (20 kHz, 25 W) 20 s 后为粗酶液。

① 游离型 VB₆ 磷酸化激酶活性分别以 PL-HCl、PM-2HCl 和 PN-HCl 为基质, 按 Kark 等 (1982) 的方法测定, 反应体系由 15 mmol/L TEA、120 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 5.5) 0.775 mL, 40 mmol/L ZnCl₂ 0.025 mL, 20 mmol/L ATP 0.05 mL, 2 mmol/L 的基质 0.05 mL 和酶液 0.1 mL 构成。② 游离型 VB₆ 非激酶催化磷酸化反应的分析, 以 γ -NPP (γ -nitrophenyl phosphate disodium salt) 和 PN-HCl 为基质, 采用 Tani 和 Ogata (1972) 的方法, 反应体系由 50 mmol/L Glycine-NaOH (pH 9.5) 缓冲液 0.75 mL, 20 mmol/L γ -NPP 0.05 mL, 2 mmol/L PN-HCl 0.05 mL, 2 mmol/L EDTA-Na 0.05 mL 和酶液 0.1 mL 构成。③ 磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶活性以 PMP-HCl 为基质, 按 Merrill 等 (1979) 的方法测定, 反应体系由 80 mmol/L NaH₂PO₄-硼酸缓冲液 (pH 9.0) 0.8 mL, 0.2 mmol/L FMN 0.05 mL, 2 mmol/L PMP-HCl 0.05 mL 和酶液 0.1 mL 构成。④ 磷酸吡哆醛水解酶活性以磷酸吡哆醛为基质, 用 Ubbink 和 Schnell (1988) 的方法测定, 反应体系由 5 mmol/L MgCl₂/50 mmol/L TEA 缓冲液 (pH 6.0) 0.85 mL, 20 mmol/L 磷酸吡哆醛 0.05 mL 和酶液 0.1 mL 构成。

酶促反应在暗室中 37℃ 的条件下进行, 反应时间分别为① 15 min, ②和③ 30 min, ④ 10 min。终止反应采用 3 mol/L HClO₄ 0.5 mL。对照均为先加 HClO₄ 后加酶液。反应生成物的分析定量采用上述的 HPLC 分离和荧光定量法。酶活力用每毫克蛋白质在 37℃ 的条件下, 30 min 催化产物的 nmol 数来表示。样品中蛋白质定量采用 Lowry 法。

2 结果

2.1 家蚕幼虫体内 VB₆ 化合物的存在形态和动态

从表 1 可以看到 5 龄起蚕开始摄食试验饲料, 3 日后不同饲料区幼虫体内 VB₆ 化合物的存在形态存在很大差异。因饲料中盐酸吡哆醇添加量的不同, 蚕体内吡哆醇含量显著变化, 其次是吡哆醛。缺乏 VB₆ 饲料区幼虫体内未检出吡哆醇, 而多量添加盐酸吡哆醇饲料区幼虫体液和组织中吡哆醇的蓄积明显可见。从各饲料区幼虫体液均没有检出磷酸吡哆醛或磷酸吡哆胺; 缺乏 VB₆ 饲料区幼虫组织中磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺含量明显低下, 但通常添加量与高添加量之间没有大的差异。

图 1 表示多量添加盐酸吡哆醇饲料区家蚕幼虫体内吡哆醇含量的变化。体液以外幼虫组织的吡哆

表 1 家蚕 5 龄 3 日幼虫体内维生素 B₆ 的存在形态

Table 1 The vitamin B₆ contents of various organs in the 5th instar of *B. mori* on the 3rd day of the diet

| 组织 Organ | 盐酸吡哆醇添加量 (μ g) | PN | PL | PM | PLP | PMP |
|---|----------------------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| | PN-HCl content of the diet | | | | | |
| 体液 hemolymph | 0 | ND | 0.1 ± 0.1 | 0.3 ± 0.0 | ND | ND |
| | 30 | 0.6 ± 0.2 | 0.7 ± 0.2 | 0.5 ± 0.0 | ND | ND |
| | 150 | 16.5 ± 1.4 | 2.9 ± 0.2 | 1.6 ± 0.4 | ND | ND |
| 中肠 midgut | 0 | ND | 0.1 ± 0.1 | 0.1 ± 0.1 | 0.7 ± 0.2 | 0.7 ± 0.2 |
| | 30 | 0.5 ± 0.3 | 1.2 ± 0.1 | 0.3 ± 0.1 | 1.6 ± 0.3 | 1.5 ± 0.1 |
| | 150 | 6.1 ± 0.3 | 1.9 ± 0.2 | 0.3 ± 0.0 | 2.0 ± 0.2 | 1.9 ± 0.5 |
| 脂肪体和皮肤肌肉 fat body with skin and muscle | 0 | ND | 0.2 ± 0.1 | 0.2 ± 0.0 | 3.1 ± 0.4 | 0.4 ± 0.1 |
| | 30 | 1.6 ± 0.2 | 3.0 ± 0.2 | 0.2 ± 0.0 | 8.0 ± 1.0 | 1.1 ± 0.1 |
| | 150 | 11.5 ± 1.2 | 3.2 ± 0.5 | 0.6 ± 0.2 | 9.2 ± 1.2 | 1.7 ± 0.2 |
| 丝腺 silk gland | 0 | ND | 0.2 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1 | 1.2 ± 0.2 | 0.5 ± 0.1 |
| | 30 | 1.1 ± 0.1 | 3.7 ± 0.5 | 0.5 ± 0.0 | 4.1 ± 0.9 | 1.2 ± 0.1 |
| | 150 | 9.0 ± 1.3 | 4.4 ± 0.5 | 0.5 ± 0.0 | 4.5 ± 1.4 | 1.6 ± 0.6 |
| 马氏管 Malpighian tube | 0 | ND | 2.6 ± 0.3 | 0.6 ± 0.3 | 12.0 ± 1.3 | 4.1 ± 1.0 |
| | 30 | 7.2 ± 1.3 | 4.3 ± 0.1 | 1.2 ± 0.2 | 25.2 ± 4.1 | 8.9 ± 1.0 |
| | 150 | 63.5 ± 12. | 5.0 ± 0.5 | 1.2 ± 0.2 | 25.9 ± 4.5 | 7.3 ± 1.1 |

数据为 mean ± SD (n = 3), ND = 未检出

Data are mean ± SD (n = 3), ND = not detected

醇含量在 5 龄前 2 日远高于体液, 随 5 龄日数的增加逐渐降低到很低的水平。5 龄前期幼虫体液吡哆醇含量逐渐增加, 第 3 日达到组织的程度, 以后和组织呈同样的降低趋势。

不论用何种饲料 (盐酸吡哆醇 30 μg 或 150 μg) 饲养 4 龄幼虫, 5 龄起蚕体内的吡哆醇均为痕迹量; 除吡哆醛外, 其它 VB_6 化合物含量也没有明显差异 (表 2)。

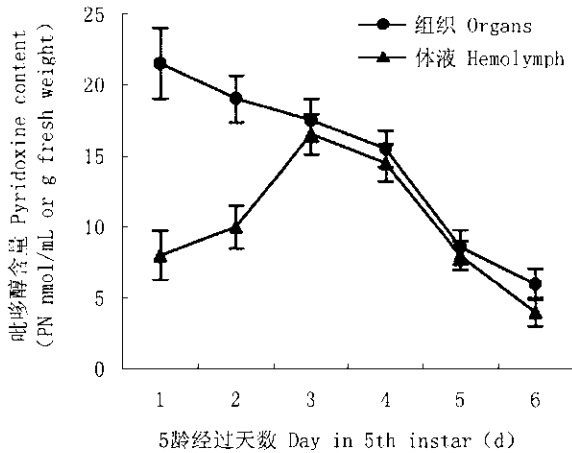


图 1 家蚕 5 龄幼虫体液和体液以外的组织中吡哆醇含量的变化

Fig. 1 Changes in the PN content of the hemolymph and total organs in 5th instar larvae

表 3 家蚕 5 龄 5 日幼虫体内吡哆醛激酶、磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶和磷酸吡哆醛磷酸水解酶的活性分布

Table 3 Activity of PL kinase, PNP/PMP oxidase and PLP phosphatase in the extracts of various organs of 5th instar silkworms on the 5th day of the diet

| 酶 Enzyme | 中肠 Midgut | 体液 Hemolymph | 脂肪体 Fat body | 皮肤和肌肉 Skin with muscle | 丝腺 Silk gland | 马氏管 Malpighian tube |
|--------------------------------|-----------|--------------|--------------|------------------------|---------------|---------------------|
| 吡哆醛激酶 PL kinase | 3.4 ± 0.4 | ND | 14.0 ± 2.6 | 8.3 ± 0.7 | 7.0 ± 0.8 | 28.4 ± 0.7 |
| 磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶 PNP/PMP oxidase | 0.4 ± 0.1 | ND | 0.6 ± 0.1 | 0.3 ± 0.0 | 0.9 ± 0.2 | 0.6 ± 0.1 |
| 磷酸吡哆醛磷酸水解酶 PLP phosphatase | 547 ± 60 | 4.5 ± 0.6 | 207 ± 21 | 114 ± 5.1 | 443 ± 44 | 1153 ± 22 |

数据为 mean ± SD (n = 3), ND = 未检出

Data are mean ± SD (n = 3), ND = not detected

3 讨论

家蚕体内维生素 B_6 的存在形态和转换代谢方式有其特殊性。用缺乏 VB_6 的饲料饲养 5 龄幼虫, 其体内没有检出吡哆醇, 吡哆醛和吡哆胺含量低下, 磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺含量显著减少。相反, 当大量供给吡哆醇时, 幼虫体内吡哆醇蓄积, 吡哆醛含量增加, 而磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺却没

表 2 5 龄起蚕体内维生素 B_6 的存在形态

Table 2 The vitamin B_6 content of newly molted 5th instar larva

| 饲料 Diet | PN | PL (nmol/g fresh weight) | PM | PLP | PMP |
|--------------------------|----|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|
| PN-HCl 30 μg | t | 1.1 ± 0.0 | 0.5 ± 0.1 | 1.5 ± 0.2 | 1.3 ± 0.1 |
| PN-HCl 150 μg | t | 2.4 ± 0.2 | 0.7 ± 0.2 | 1.9 ± 0.4 | 1.5 ± 0.3 |

数据为 mean ± SD (n = 3), t 为痕迹量

Data are mean ± SD (n = 3), t = trace

2.2 幼虫体内 VB_6 转换代谢酶的活性分布

根据已报道的各种 VB_6 转换代谢酶的特性和检测方法, 从家蚕幼虫体内检出吡哆醛激酶、磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶和磷酸吡哆醛磷酸水解酶。同时还检出以 ATP 以外的磷酸供体催化吡哆醇磷酸化的转换反应。另一方面, 从所有的幼虫组织均没有检出催化吡哆醇和吡哆醛之间直接转换、以及将吡哆醛转变为吡哆酸的酶活性。

表 3 为 5 龄 5 日幼虫体内 VB_6 转换代谢酶的活性分布。除体液外, 其它组织中均存在吡哆醛激酶和磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶。所有组织的磷酸吡哆醛磷酸水解酶活力都远远高于吡哆醛磷酸化激酶和磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶。

有显著变化。这表明, 家蚕体内实际上发挥维生素 B_6 生理作用的辅酶型磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺含量存在稳定性。家蚕体液中不存在磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺。幼虫体内吡哆醇的蓄积完全依赖于饲料中吡哆醇的过量供给和摄入。幼虫进入减食期后, 体液和其它组织中的吡哆醇均很快减少到很低的程度。起蚕体内吡哆醇也仅为痕迹量。

动物试验表明, 肠腔中的吡哆醇以单纯扩散的方式进入体内 (Tani, 1980)。在我们的试验中, 5

龄幼虫体液的吡哆醇浓度是肠腔内容物的 1/3 左右, 而 5 龄前期, 幼虫组织中的吡哆醇浓度远远高于体液 (图 1)。推测肠腔中的吡哆醇也是以单纯扩散的方式穿过中肠进入家蚕体内; 而体液中的吡哆醇通过主动吸收的方式进入各种幼虫组织。

从体液以外的幼虫组织均检出催化游离型 VB₆ 磷酸化的吡哆醛激酶、磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶和磷酸吡哆醛磷酸水解酶。虽然还检出以 ATP 以外的磷酸供体催化吡哆醇磷酸化的反应, 但转换活力远远低于吡哆醛激酶的作用。同时没有检出催化吡哆醇和吡哆醛之间直接转换的酶活力。家蚕体内 VB₆ 化合物的基本代谢途径为吡哆醇→磷酸吡哆醇→磷酸吡哆醛→吡哆醛。饲料中的吡哆醇直接进入体液, 体液中的吡哆醇被各种组织吸收后, 在各自的吡哆醛激酶和磷酸吡哆醇/磷酸吡哆胺氧化酶的作用下, 转变为辅酶型磷酸吡哆醛。家蚕不同于哺乳动物, 没有特定的磷酸吡哆醛形成组织和磷酸吡哆醛转送机制。

从家蚕体内没有检出哺乳动物体内 VB₆ 的排泄型吡哆酸, 同时也检测不出催化吡哆醛转变为吡哆酸的 FAD 要求性醛氧化酶和醛脱氢酶活性。推测家蚕体内缺乏将吡哆醛转变为吡哆酸的转换途径, 过量形成的磷酸吡哆醛被磷酸酶水解成吡哆醛后直接排出体外。

家蚕幼虫所有组织都具有很强的磷酸吡哆醛磷酸水解酶活力。没有和蛋白质结合, 高于生理要求量的剩余磷酸吡哆醛很难避免其水解作用。推测家蚕体内除 VB₆ 要求性酶以外, 缺乏哺乳动物体内血清蛋白等具有储存 VB₆ 功能的磷酸吡哆醛结合蛋白。这是家蚕体内磷酸吡哆醛含量存在稳定性的原因, 同时也是用缺乏 VB₆ 的饲料饲育各龄起蚕, 幼虫因得不到与生长发育相对应的补充 VB₆ 而很快死亡的主要原因。

致谢 本试验主要工作在日本国立岐阜大学农学部食品营养学研究室完成, 感谢柘植治人和早川享志先生的大力支持。

参 考 文 献 (References)

- Kark J A, Haut M J, Hicks C U, Mcquilkin C T, Reynolds R D, 1982. A rapid fluorometric assay for erythrocyte pyridoxal kinase. *Biochem. Med.*, 27: 109–120.
- Kazarinoff M N, McCormick D B, 1975. Rabbit liver pyridoxamine (pyridoxine) 5'-phosphate oxidase. *J. Biol. Chem.*, 250: 3 436–3 442.
- Lumeng L, Brashear R E, Li T K, 1974. Pyridoxal 5'-phosphate in plasma: source, protein-binding, and cellular transport. *J. Lab. Clin. Med.*, 84: 334–343.
- Lumeng L, Li T K, 1978. Plasma content of B₆ vitamers and its relationship to hepatic vitamin B₆ metabolism. *Fed. Proc.*, 37: 558–563.
- McCormick D B, Gregory M E, Snell E E, 1961. Pyridoxal phosphokinases. *J. Biol. Chem.*, 236: 2 076–2 088.
- Merrill A H, Kazarinoff M N, Tsuge H, Horiike K, McCormick D B, 1979. Pyridoxamine (pyridoxine) 5'-phosphate oxidase from rabbit liver. *Method Enzymol.*, 62: 568–574.
- Morino Y, Wada H, Morisue T, Sakamoto Y, Ichihara K, 1960. Enzymatic studies on pyridoxine metabolism IV. *J. Biochem.*, 48: 18–27.
- Stanulovic M, Jerenic V, Leskovic V, Chaykin S, 1976. New pathway of conversion of pyridoxal to 4-pyridoxic acid. *Enzyme*, 21: 357–369.
- Tani Y, 1980. Vitamin B₆ (The vitamin society of Japan). Tokyo: Chemistry Coterie Press. 142–151. (in Japanese)
- Tani Y, Ogata K, 1972. Studies on vitamin B₆ metabolism in microorganisms part IX. *Agric. Biol. Chem.*, 36: 173–180.
- Tani Y, Tochikura T, Yamada H, Ogata K, 1968. Studies on vitamin B₆ metabolism in microorganisms part VII. *Agric. Biol. Chem.*, 32: 1 220–1 227.
- Tsuge H, Hirose N, 1989. HPLC analysis of vitamin B₆ derivatives. *Vitamin (Japan)*, 63: 349–360 (in Japanese with English abstract).
- Turner J B, 1961. Pyridoxal phosphate breakdown by an alkaline-phosphatase preparation. *Biochem. J.*, 80: 663–668.
- Ubbink J B, Schnell A M, 1988. High-performance liquid chromatographic assay of erythrocyte enzyme activity levels involved in vitamin B₆ metabolism. *J. Chromatogr.*, 431: 406–412.