

21 アルカリ加水分解法による Dibenzoyl thiamine 定量の一変法

21. A modified procedure for the determination of dibenzoyl thiamine by alkaline hydrolysis method.

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技師 福士 敏 雄

Dibenzoyl thiamine (以下 DBT と略す) の定量法としてはアルカリ加水分解によるいわゆるアルカリ法¹⁾, 吸光度測定法²⁾, Hydroxamic acid 法³⁾, 塩酸システイン法⁴⁾, タカジアスターゼ法⁵⁾ 等が報告されているが, 操作が簡易であるという点で食品についてはアルカリ法が一般におこなわれているようである。著者はこのアルカリ法について検討したところ, 等モルの DBT および B₁ はこの方法では同じ蛍光度が得られ, また B₁ のみをアルカリ法によって処理するとその検量曲線は定量的な直線をしめすことから, DBT 定量にさいして B₁ 標準液の添加実験を行なつてもさしつかえなく, DBT, B₁ の共存する場合は B₁ 塩酸塩単位でその合計値が定量されることを認めた。

I DBT および B₁ のチオクロム生成量 におよぼすアルカリ水解時間の影響

さきに鎌田等¹⁾は DBT をアルカリ水解するさいに水解時間を異にしてえられる Thiochrome (The) 蛍光度の変化を報告しているが, 著者は B₁ の場合の蛍光度の変化を試験して DBT と比較した。

試験方法

(1) 供試 DBT

市販品を稀アルコールより 2 回再結し, 103~105°C, で 2.5 時間乾燥後使用した。mp. 173~174°C。

(2) 加水分解ならびに蛍光度の測定

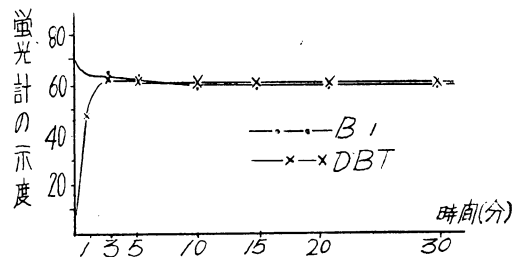
DBT, B₁ ともに 10⁻⁵ M 溶液になるように 0.1N 塩酸に溶解して供試液とした。この両供試液につきその 1.0cc に対し N 苛性ソーダ 1.0cc を添加し, 時々ゆるく振り混ぜながら 20°C で所定時間 (1~30 分の間で変化) 放置して加水分解をおこなつた。水解後ただちに N 塩酸 1.5cc を加えて酸性とし以後 BrCN 法により酸化し, 蛍光光度計で The の蛍光度を測定した。

結果

得られた蛍光度の変化は第 1 図のとおりである。すなわち DBT の場合はほぼ 3 分で最高となり, 20 分までは殆んど変化なく, その後徐々に低下することは鎌田等の成績と同様である。B₁ の場合では同一アルカリ処理条件で 3 分後にある程度急に低下し, 以後徐々に減少するが 10~15 分以降は DBT ときわめて近似的数値で平行する。このことから DBT は 3~5 分で大部分が水解され, その後は B₁ と同様の経過をとることがわかる。両者共減少速度は緩慢で

あり, かつ等モルの DBT と B₁ は水解時間 20 分というアルカリ法の同条件下で同程度の蛍光がえられた。

第 1 図 DBT および B₁ のアルカリ水解時間とチオクロム蛍光度変化 (供試量: 両者とも 10⁻⁸ モル)



II DBT および B₁ のアルカリ法における検量曲線

B₁ を用いて前記アルカリ法条件下における検量曲線を作り, DBT 曲線および B₁ の BrCN 常法のそれと比較した。

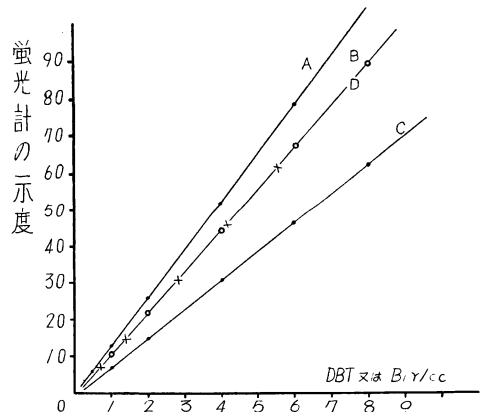
測定法

各既知濃度のものにつき前回同様におこなつたが, 水解時間は正確に 20 分とした。

結果

盲験値をさしひいた検量曲線は第 2 図のとおりである。

第 2 図 検量曲線



A: B₁ の BrCN 法

B: B₁ のアルカリ法 (—○—○—)

C: DBT のアルカリ法

D: C における BTB 量を B₁ に換算したものと (—×—×—)

いずれも試験した濃度範囲ではほぼ0点をとる定量的な直線でAはB₁のBrCN法の曲線、BはB₁のアルカリ法における曲線であつて、アルカリ法によると蛍光度は約85%であつた。CはDBT・アルカリ法の曲線であるが、いまこのDBT量をB₁に換算した数値を横軸にとつて書き改めたため、これをDとすれば、BとDは全く同一線上に重なつた。このことはDBTをB₁塩酸塩単位で定量表現する場合はB線をそのままDBTの定量曲線に使用できること、またB₁標準液の添加実験も可能であることを意味する。

Ⅲ アルカリ法の一部改良

The法によつてB₁を定量するには検量曲線を用いるよりもB₁標準液の添加実験によつて測定するのが望ましく、従来蛍光計を使用する場合はすべてこれが普通となつている。

とくにアルカリ処理する場合は僅かな条件差によつて測定値に誤差を生じ易いと考えられるから、主験の他に添加も平行して行なうべきである。

しかし著者の経験では0.1N塩酸に溶解した20mg% DBT標準液は短時間で器底にDBTと思われる鱗様析出物を生じ易く、その寿命は比較的短いようで、この点不便である。今回前2実験の結果からB₁標準液の添加実験によつても実用上満足がえられることがわかつたので、従来のアルカリ法をつぎのように一部改良した。

試料液

DBTおよびB₁を含む場合、B₁として0.5~8.0r/ceとるように浸出液を作る。

定量法

容量約50cc共栓遠沈管を3本用意し、aは盲験、bは主験、cは添加用とする。このおのおのに試料液1.0ccずつをとり、cにはB₁標準液1.0cc(0.5~2.0rを含む0.1N塩酸液)を添加し他の2本には0.1N塩酸各1.0ccを加える。ついで各管にN苛性ソーダを同量ずつ加えてpH12~13とし(通常1.0cc、あらかじめ別にテストする)時々ゆるく振り混ぜながら20°C内外で正確に20分間放置して水解する。水解後ただちにN塩酸を加えて酸性とする(N苛性ソーダ1.0ccにつきN塩酸1.5ccを加える)。以後a、b、cの各管につきBrCN法あるいは赤血塩法にしたがつて処理したのち、蛍光度を蛍光光度計で測定する。a、b、cの各管からえられた蛍光度をA、B、Cとすると供試液1.0cc中のB₁量は次式によつて求められる。

$$\text{供試液 } 1.0\text{cc 中の } B_1 \text{ 含量} \quad X(r) = \frac{B-A}{C-B} \times B_1 \text{ 添加量 } (r)$$

DBTに換算するには係数1.455を乗じて算出する。

Ⅳ 本変法におけるDBT再検率

まず上記の方法にしたがいDBT 0.1N塩酸溶液4.0r/ceについて同一測定を8回おこなつた。その再検率の誤差範

第1表 本法におけるDBTの再検率誤差範囲
(供試量 DBT 4.0r, 添加量 B₁ 2.0r)

試験 No.	DBT 定量値 (r)	再 検 率 (%)
1	3.904	97.6
2	3.985	99.6
3	4.088	102.2
4	3.920	98.0
5	4.065	101.5
6	3.928	98.2
7	4.017	100.4
8	3.912	97.8
		$m \pm \delta = 99.2 \pm 1.86$

第2表 本法によるDBTの再検率

供試DBT量 (r)	B ₁ 換算値 (r)	B ₁ 添加量 (r)	定量値 (B ₁ として)(r)	再 検 率 (%)
0.5	0.344	0.5	0.339	98.6
1.0	0.687	0.5	0.677	98.5
2.0	1.374	1.0	1.348	98.1
4.0	2.748	1.0	2.763	100.5
6.0	4.122	1.0	4.189	101.6
8.0	5.496	1.0	5.533	100.7
				平均 99.7

囲は第1表のごとく99.2±1.9%程度であつて、The法そのものの誤差もこれ位であるからアルカリ水解によつてとくに測定値に変動をきたすことはないと考えられる。つぎにDBT 0.5~8.0r/ceについて行なつた再検率(各4回の平均)は第2表のとおり98~101%、平均99.7%でほとんど実用上完全であつた。

Ⅴ 考 察

従来のアルカリ法でDBTとB₁が等モルであれば同じ蛍光が得られることから、食品についてアルカリ法で測定されたDBT量はDBTのほかにもしB₁が含まれている場合は、そのB₁もDBTに換算されて回収された合計値であることがわかる。この点では本法も同様にB₁に換算された合計値が測定されるが、添加実験によつて測定精度が高められ、かつ食品の栄養成分表示においてB₁は塩酸塩としてあらわすのが普通であるから、そのままの数値を用いる利点もある。

試料中にCocarboxylase (CoC)が含まれている場合は、従来どおりタカジアスターゼによつて水解したのち本法で定量すればDBT、B₁およびCoCを含む総B₁が定量できる。またDBTのみを分別定量するには、まずBrCN法で直接B₁を定量し、つぎに本法によつて合計B₁量を定

量すれば両者の差が DBT に由来する B₁ 量であるから係数を乗じて求めることができる。

要 約

(1) 等モルの DBT および B₁ をそれぞれ DBT・アルカリ法における加水分解条件で処理し、The 法によつて蛍光を比較すると水解時間 10 分以後はほとんど同等の蛍光がえられた。

(2) アルカリ法における DBT 検量曲線を B₁ に換算して求めると、このものは B₁ のアルカリ法における検量曲線と一致し、定量的な直線であつた。

(3) 上記の結果から DBT のアルカリ法による定量にさいし、B₁ 標準液の添加実験を行なつてもさしつかえないことを認めアルカリ法の一部を改良した。

(4) 本変法によれば DBT は B₁ として測定され、DBT 0.5~8.0r/ce について行なつた再検率の平均は 99.7% であつた。B₁ 混在の場合はその合計値が測定されるから簡単に B₁、DBT の分別定量ができる。

文 献

- 1) 鎌田, 堀: 武田研究所年報, **14**, 19 (1954)
- 2) 鎌田, 備中, 中山: 武田研究所年報, **16**, 8 (1957)
- 3) 鈴置: ビタミン, **7**, 330 (1954)
- 4) 村田, 山野: ビタミン, **13**, 105 (1957)
- 5) 川北, 林: ビタミン, **14**, 199, 202 (1958)

(本報はビタミン第 18 巻第 3 号に登載したことを附記する)