

## 46 チオクローム螢光法によるビタミンB<sub>1</sub>の定量 ——定量における誤差要因について——

山本勇夫 松田和子

### 諸 言

ビタミンB<sub>1</sub>（以下B<sub>1</sub>と略称する）の定量法として、現在各方面で利用されているものにチオクローム螢光法がある。この方法については、すでに多くの人々により検討されていて報告<sup>1~5)</sup>も多いが、螢光法により同じ測定者が同一の試料について測定をくりかえすと測定値が許容誤差の範囲外にバラツクことはしばしば経験することである。バラツキの原因は種々考えられるが、経験上最も大きな誤差要因になると考へられる酸化反応条件による定量誤差要因を推計学的に検討した。さらにB<sub>1</sub> 塩酸塩強化押麦について、酸化反応における最適条件を理論的に明らかにしたので報告する。

### 実験方法

#### 1. 酸化反応操作における諸因子の検討

チオクローム螢光法の酸化反応操作はB<sub>1</sub>溶液に赤血塩をアルカリ性で作用させ、B<sub>1</sub>をチオクロームに酸化する。生じたチオクロームにn-ブタノールを加えてチオクロームをブタノールに転溶させる。次に無水硫酸ソーダを加えて、十分に混合し、3分間遠心分離を行って上澄液のブタノール層を駒込ピペットで比色用無螢光試験管にとって、チオクロームの生成率（螢光強度）を螢光光度計で測定する。そこで標準B<sub>1</sub> 塩酸塩を用いて酸化反応操作の条件によって定量誤差要因になると推定される諸因子について検討した。すなわち、1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間（B<sub>1</sub>溶液に1%赤血塩液をアルカリ性で反応させている時間）無水硫酸ソーダ量、混合回数、放置時間（無水硫酸ソーダを加えて混合した後、遠心分離を行うまでの時間）遠心分離回転数、以上7つの因子を取り上げて各因子を3条件に分けた。

因子及び水準の分け方はTable 1の通りである。この7因子、3水準の実験条件を3<sup>n</sup>型直交配列表のL<sub>27</sub>(3<sup>13</sup>)の式に割りつけてランダムに実験した。実験は共栓遠心沈澱管にB<sub>1</sub>溶液を1mlとり、酸化してチオクロームを生成させ、螢光強度を測定した。対照として硫酸キニーネの0.5μg/ml溶液を螢光光度計の目盛65%にセットした。螢光光度計は励起フィルター365mμ、選択フィルター470mμを用い、またB<sub>1</sub>溶液濃度は0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0μg/mlの各濃度についてそれぞれ測定した。

Table 1 Experimental conditions

Mark	Factors	Levels		
		1	2	3
A	1% K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (ml)	0.1	0.4	0.7
B	30% NaOH (ml)	0.5	3.0	5.0
C	Reaction time (min)	0.5	5.0	10.0
D	Anhydrous Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	1	3	5
E	Shaking (times)	10	100	200
F	Centrifuge (r.p.m.)	2000	3000	4000
G	Time for laying (min)	0.5	15.0	30.0

#### 2. B<sub>1</sub> 塩酸塩強化押麦の抽出液の調製

押麦のB<sub>1</sub>溶液の調製は次の通りである。

押麦を粉碎機で粉末にし、この試料5gを採取し、乳鉢で水20mlとともに十分に磨碎した後、0.1N硫酸60mlで洗いながら内容物を100mlのメスフラスコに完全に移す。次に沸騰浴中で30分間加温を行い、冷後、4M酢酸ソーダ4mlを入れ、試料液のpH値が4.5~4.7になるように調製する。さらに2%ジアスター溶液を5ml加え、37°±0.5°Cの恒温器に一夜放置後、冷却し、水で100mlにして済過し、試料溶液とした。このものから1ml(B<sub>1</sub>濃度は約2.5μg/mlである)をとって測定した。同時に押麦抽出溶液1mlに標準B<sub>1</sub>溶液(濃度は0.5μg/ml)1mlを加えたものについても測定した。

### 実験結果

#### 1. 標準B<sub>1</sub>溶液における酸化反応条件

実験結果を分散分析した結果をTable 2に示す。

Table 2 Factors and level of significance by analysis of variance

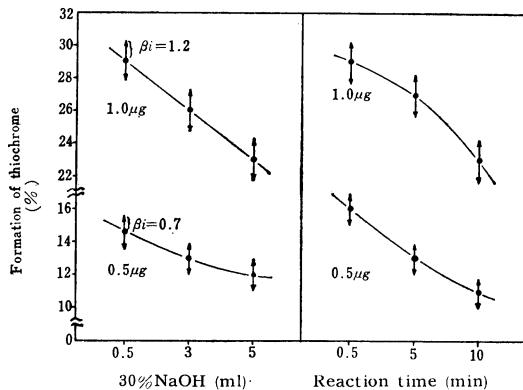
Standard vitamin B <sub>1</sub>	Factors	Level of significance (P<0.1)
0.5 μg	B (30% NaOH)	0.01
	C (Reaction time)	0.01
	B×C	0.01
1.5 μg	A (1% K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )	0.05
	B (30% NaOH)	0.01
	C (Reaction time)	0.01
	B×C	0.01
2.0 μg	E (Shaking)	0.10
3.0 μg		

$B_1$  溶液濃度、因子、有意水準との関係を示した。有意水準は10%まで計算した。これによると、 $B_1$  濃度 0.5~3.0  $\mu\text{g}$ において30%苛性ソーダ量及び反応時間と、この2つの交互作用は有意水準1%で、これらの因子の酸化条件のちがいにより、チオクローム生成率（以下生成率と略称する）に有意の影響を与えていたことが分った。また、 $B_1$  濃度 1.5~3.0  $\mu\text{g}$ においては、1%赤血塩量は5%，混合回数は10%の有意水準でそれぞれの条件により、生成率に影響を与えている。しかし、 $B_1$  濃度 0.5~3.0  $\mu\text{g}$ において遠心分離回転数、無水硫酸ソーダ量、及び放置時間は条件によって生成率に影響しないことが分った。

次に有意であった因子について、その水準の母平均  $\mu_i$  の点を推定してグラフ化を行った。母平均は  $\hat{\mu}_i = \bar{x}_i = a + \frac{Y_i}{n_i} \times \frac{1}{h}$  (a: 仮の平均値,  $Y_i$ : i 水準のデータの合計,  $n_i$ : 加えたデータの数, h: 倍率) の式から算出した。

Fig. 1 は  $B_1$  濃度が 0.5  $\mu\text{g}$  1.0  $\mu\text{g}$  において30%苛性ソーダ量、反応時間が生成率にどのように影響しているかを図示したものである。生成率の数値は硫酸キニーネの 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液を蛍光光度計の目盛65%にセットしたときの各  $B_1$  濃度の蛍光光度計の読みである。●印は推定した平均値をプロットしたものである。また矢印の幅は推定の精度を確率95%で求めたものである。

Fig. 1 Effects of 30% NaOH and reaction time on formation of thiochrome about each densities of vitamin  $B_1$



精度は  $\beta_i = \{ t(\phi E \cdot \alpha) \} \cdot \bar{x}_i = t(\phi E \cdot \alpha) \sqrt{\frac{V_E}{n}}$  の式から求めた。Fig. 1 より30%苛性ソーダ量、反応時間が大きくなると、 $B_1$  濃度 0.5  $\mu\text{g}$ , 1.0  $\mu\text{g}$  ともに生成率の減少が見られる。0.5  $\mu\text{g}$ において30%苛性ソーダ量と反応時間とを比較すると、反応時間の方の変動が大きい。このことは、反応時間の方がより大きく生成率に影響していることを示している。

Fig. 2 は  $B_1$  濃度が 1.5  $\mu\text{g}$ , 2.0  $\mu\text{g}$ , 3.0  $\mu\text{g}$  のときの30%苛性ソーダ量、反応時間の影響を図示したものである。これらの濃度においても30%苛性ソーダ量、反応時間

が大きくなるにしたがって、生成率の減少が見られる。

Fig. 3 は  $B_1$  濃度 1.5  $\mu\text{g}$ , 2.0  $\mu\text{g}$ , 3.0  $\mu\text{g}$  について、1%赤血塩量、混合回数の生成率への影響を図示したものである。先の30%苛性ソーダ量、反応時間ほどの大きな有意差は見られないが1%赤血塩量は5%，混合回数は10%の有意水準でそれぞれ影響している。1%赤血塩量は添加量が多くなるにしたがって生成率が減少している。これに対して混合回数は回数が多くなるにしたがって生成率が上っている。

Fig. 2 Effects of 30% NaOH and reaction time on formation of thiochrome about each densities of vitamin  $B_1$

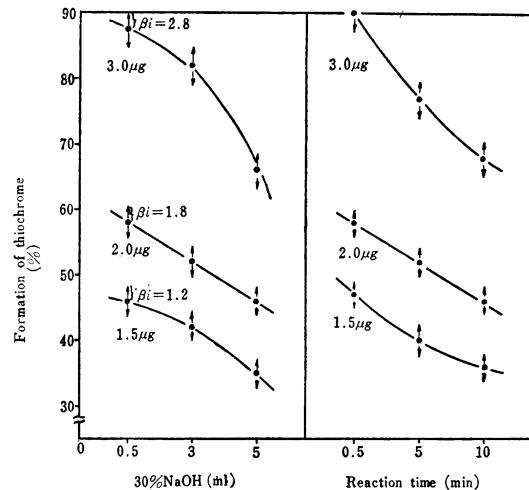
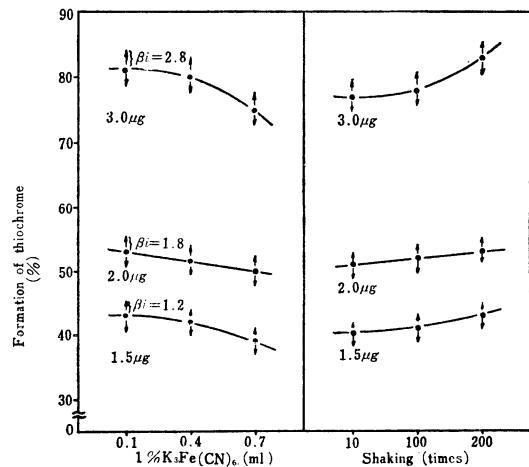


Fig. 3 Effects of 1%  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  and shaking on formation of thiochrome about each densities of vitamin  $B_1$



## 2. ビタミン $B_1$ 塩酸塩強化押麦における酸化反応条件と最適条件の推定

押麦に強化したビタミン  $B_1$  塩酸塩を定量するときの酸

化反応条件の検討を行った。先の実験結果(1)で1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間の3因子がチオクローム生成率に大きな影響を与えていたことが分った。そこで、B<sub>1</sub> 塩酸塩強化の押麦について、これらの3因子をとり上げて、3元配置法によりくりかえし2回の組合せ実験を行った。実験条件は Table 3 の通りである。この3因子以外の因子については、無水硫酸ソーダ3g、混合回数100回、遠心分離回転数3,000 r.p.m.、放置時間5分に固定して行った。

Table 3 Experimental conditions of pressed barley

Mark	Factors	Level	1	2	3
A	1% K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (ml)		0.1	0.4	0.7
B	30% NaOH (ml)		0.5	3.0	5.0
C	Reaction time (min)		0.5	5.0	10.0
D	Anhydrous Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)				3
E	Shaking (times)				100
F	Centrifuge (r.p.m.)				3000
G	Time for laying (min)				5

データを分散分析した結果、1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量は1%有意水準で生成率に影響があった。なお、反応時間は25%で有意であった。

Fig. 4 Effects of 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 30% NaOH and reaction time on formation of thiochrome from vitamin B<sub>1</sub> added to pressed barley.

- I : 2.5μg vitamin B<sub>1</sub> extracted from pressed barley  
II : 2.5μg vitamin B<sub>1</sub> extracted from pressed barley + 0.5μg standard vitamin B<sub>1</sub>

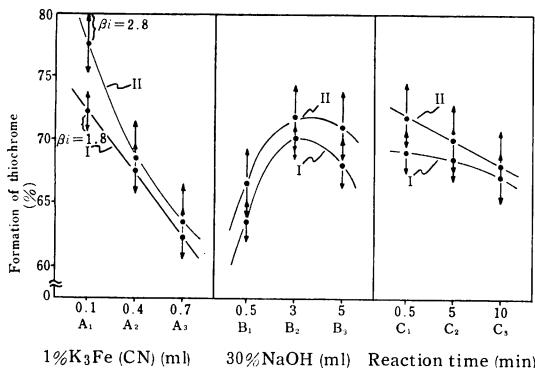


Fig. 4 は、B<sub>1</sub> 強化押麦において、1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間の生成率に及ぼす影響を図示したものである。曲線Iは押麦抽出溶液1mlについて図示したものである。グラフIIは押麦抽出溶液1mlに標準B<sub>1</sub>(濃度は0.5μg/ml)を1ml加えたものについて図示したものである。

曲線I, IIは大体似たような形を示している。実験結果(1)の標準B<sub>1</sub>溶液の場合と比較すると、押麦では1%赤血塩量による生成率に及ぼす影響が増大している。また反応時間による影響は小さくなっている。一方30%苛性ソーダ量による影響は標準B<sub>1</sub>溶液の場合には添加量が多くなると一方的に減少するのに対して、強化押麦の場合には条件B<sub>2</sub>でピークになる曲線になっている。1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間による生成率への影響が標準B<sub>1</sub>と押麦抽出液とで、いかなる理由によって異なるのか明らかでないが、押麦抽出液においては、押麦中のタンパク質、無機質(この実験ではペーミットによるイオン交換は行わなかった)がチオクローム生成、反応、チオクローム螢光などに影響しているのではないかと思われる。しかし押麦においても1%赤血塩、30%苛性ソーダ量、反応時間の3因子は酸化反応における大きな定量誤差要因になることは確かである。次にFig. 4において、チオクローム生成率の最も高い点を最適条件とすると、最適条件はA<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>となる。この点の推定を行うと、 $\hat{\mu} A_i B_j C_k = \overbrace{\mu + a_i + b_j + (ab)}^{i=1,2,3} + \overbrace{c_k}^{k=1,2,3} = \overbrace{\mu + a_i + b_j + (ab)}^{i=1,2,3} + \overbrace{\mu + c_k - \hat{\mu}}^{k=1,2,3}$ の式から求め、曲線Iでは $\hat{\mu} A_1 B_2 C_1 = 83.02 \pm 4.11\%$ となり、曲線IIでは $\hat{\mu} A_1 B_2 C_1 = 84.21 \pm 4.35\%$ である。

## 要 約

1) チオクローム螢光法における酸化反応の条件のうち定量誤差要因になるとと思われる7因子について検討した。即ち1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間、無水硫酸ソーダ量、混合回数、遠心分離回転数、放置時間について推計学的に検討した結果、30%苛性ソーダ量、反応時間は標準B<sub>1</sub>濃度0.5~3.0μgでチオクローム生成率に有意水準1%で影響することが分った。またB<sub>1</sub>濃度1.5~3.0μgにおいて1%赤血塩量は5%、混合回数は10%の有意水準で影響することが分った。これらのことにより、チオクローム螢光法によって、B<sub>1</sub>を定量するときには、酸化反応条件で1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間、混合回数の各条件には特に注意を払う必要があると思われる。

- 2) 無水硫酸ソーダ量、遠心分離回転数、放置時間はB<sub>1</sub>濃度0.5~3.0μgにおいて、とり上げた水準では、チオクローム生成率に影響は見られなかった。  
3) B<sub>1</sub>強化押麦について1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量、反応時間を検討した結果、1%赤血塩量、30%苛性ソーダ量は1%，反応時間は25%でそれぞれチオクローム

生成率に影響があった。

終りにこの実験に対し、ご助言をいただいた道立衛生研究所生活科学部森量夫、川端純一両氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 渡辺厚、藤原洋、吉田慰子：薬誌，**73**, 1272 (1953)
- 2) 桜井芳人他：ビタミン，**10**, 347 (1956)
- 3) 堀尾嘉友：ビタミン，**21**, 515 (1960)
- 4) Hennessy, cerecedo: J. Am. Chem. Soc., **61**, 179 (1939)
- 5) The Association of vitamin chemists : Methods of vitamin Assay. Third Edition. P. 123~145 (1966)

### 46 The Determination of Vitamin B<sub>1</sub> by a Thiochrome Fluorometric Method

#### —Sources of Variation in Determination—

Isao Yamamoto and Kazuo Matsuda  
(Hokkaido Institute of Public Health)

The thiochrome method is more widely applicable to food and feed products. This method depends upon the oxidation of thiamine to thiochrome, which fluoresces in ultraviolet light. Seven sources of errors influencing at oxidation reaction in this method were statistically examined. Seven sources of errors were volume of 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 30% NaOH, anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and reaction time, shaking times, centrifuge and time for laying.

Significant differences ( $P < 0.01$ ) were observed in 30% NaOH and reaction time at the 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0  $\mu\text{g}$  of thiamine hydrochloride. The 1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> was statically significant ( $P < 0.05$ ) and shaking times was significantly ( $P < 0.1$ ) at the 1.5, 2.0 and 3.0  $\mu\text{g}$  of thiamine hydrochloride. No significant differences ( $P > 0.1$ ) were found in the other sources of errors.