食用作物のリボフラビンに関する基礎的研究 Foundamental Studies on the Riboflavin of the Edible Crops

(第 3 報) 玄米のリボフラビン定量法について
Part 3 On the Riboflavin Estimation of Rice Kernels

(昭和 31 年 6 月 5 日受理)

曾 根 清 秀
(Kiyohide Sone)

緒 言

玄米の総 B₂ 含量を従来¹⁾のルミフラビン螢光比色法²⁾によつて定量した際、(1) 試料を糊化してからジアスターゼによつて水解したものと、糊化の操作を省略して水解したものとは前者が高値を与える。(2) ジアスターゼ水解は温度を高めることによつて 38°C 処理よりも早く高値に達する、ことが見られたので水解処理の条件を

オ 1 図 光 分 解 装 置

(注) (i) 水槽…幅 (31.5 cm) × 長 (24.0 cm) × 高 (22.0 cm) (a) 試験管だて (b) 温度調節器
(c) 投込式ヒーター (d) 光分解管…径 (2.5 cm) × 高 (11.0 cm) (e) 光源…200 W. マツダ連続巻単コイル白熱電球 (f) 光源距離

検討するとともにルミフラビン螢光比色法の他の操作についても検討を加え同法の簡易化をはかつた。

実験材料ならびに方法

著者は始めに遊離 B₂ の結晶を溶かした純 B₂ 水溶液を用いてルミフラビンの生成や移行条件などを検討し、次に玄米浸出液を材料としたときの光分解条件を見、さらに以上の成績を用いてジアスターゼ水解処理の温度、時間、糊化などの諸因子を検討した。実験には第 1 図に示した光分解装置を用い、螢光はベックマン DU 型光電光度計によつて測定した。

実験結果とその考察

ルミフラビン螢光比色法には(1) 浸出、(2) 光分解、(3) 盲螢光物質の除去、(4) ルミフラビンの抽出、(5) 比色の 5 段階の操作があるが、本報ではルミフラビンの生成、抽出、比色の諸条件を先に、次いで浸出の条件を検討した。

(I) ルミフラビンの生成におよぼす反応温度、時間、アルカリ濃度の影響

純 B₂ 溶液を光分解するときの反応温度、時間、アルカリ濃度の 3 因子を種々に組み合わせたときに得られたルミフラビンの生成量を第 1 表に示す。値は 4 検体をそれぞれ 3 回測定した読みの平均値を最大値 100 とした相対値で表してある。(以下各項の数値もこれに準ずる。)

第 1 表

温度(°C)	10			20			30			40			50		
	アルカリ濃度(N)			アルカリ濃度(N)			アルカリ濃度(N)			アルカリ濃度(N)			アルカリ濃度(N)		
時間(分)	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
30	84	89	92	96	100	99	100	99	94	91	90	79	85	75	54
60	85	90	94	96	100	97	97	97	85	86	78	64	68	56	32
90	85	91	95	95	98	93	95	93	78	81	70	53	63	43	24

注 (1) 反応液: 200μg% 純 B₂ 溶液 (1 ml) + 水 (4 ml) + 苛性ソーダ溶液 (5 ml)

(2) 光分解条件: マツダ 200 W 電球, 電圧 100 V, 光源距離 20 cm.

10°C においてはアルカリ濃度 0.5 N, 1.0 N, 2.0 N と
も 90 分までルミフラビン量は増加の傾向を示すが、
20°C 以上では分解時間の延長と共に減少しており 40°C
以上ではアルカリ濃度が高いほどこの傾向が著しい。
20°C, 1.0 N におけるルミフラビンの生成は 8 分で 93,
15 分で 99 となっており 1.0 N では短時間で最高値に
達することが知られる。また 1.0 N, 30 分では 20°C,
25°C 共に 100, 30°C で 99 を示した。以上の結果から
光分解の温度, アルカリ濃度条件は 20~25°C では
1.0 N, 25~30°C では 0.5 N が最適と考えられる。

(II) 照度の影響

照度に影響する因子としては光源の種類他に光源距
離, 電圧の二つが挙げられる。

光源距離

光源距離の相異によるルミフラビン生成量の変化を照
度変化と関連づけて示せば第2図の通りで, ルミフラビ

第2図

注 (1) 反応液: 200 μ g% 純 B₂ 溶液 (1 ml)+水
(4 ml)+2N-NaOH (5 ml)
(2) 光分解条件: 200 W, 100 V, 30 分, 30°C

ンの生成量は 20 cm, 11,600 lx で最大値を示しており従
来用いられている光源距離 20 cm は適当と考えられる。

電圧

電圧の変動によるルミフラビン生成量の変化を照度と
関連づけて検討した結果は第3図の通りで, ルミフラビ
ン生成量は 100 V, 11,600 lx において最大値を示し,
8,000 lx 以下では低下している。以上の結果から光分解
の時の照度は 11,600 lx を保たせる必要があり, それ以
上はむしろ好ましくない。

第3図

注 (1) 反応液: 200 μ g% 純 B₂ 溶液 (1 ml)+水
(4 ml)+2N-NaOH (5 ml)

(2) 光分解条件: 200 W, 30 分, 25°C, 20 cm

(III) ルミフラビンのクロロホルムへの移行率に及ぼす酢酸添加量の影響

氷酢酸添加量の影響を検討した結果を第4図に示す。

ルミフラビンの移行は氷酢酸添加量 1.0 ml において相

第4図

注 (1) 反応液: 200 μ g% 純 B₂ 溶液 (1 ml)+水
(4 ml)+2N-NaOH (5 ml)

(2) 光分解条件: 200 W, 100 V, 30 分, 25°C,
20 cm

対値 100 となり 1.25 ml まで一定しているが更に添加
量を増すとルミフラビンの移行が低値になることが知ら
れる。以上からルミフラビンのクロロホルムへの移行を
充分におこなわせるためには

氷酢酸添加量(ml)=アルカリ総濃度(N)×

反応液量(ml)/10

とする必要がある。

栄 養 と 食 糧

(IV) ルミフラビン移行率に及ぼすクロロホルム使用量の影響

同一量の反応液に加えるクロロホルム量を変えクロロホルム 1 ml に移行するルミフラビン量を実測した結果を第 2 表に示す。

第 2 表

クロロホルム 使用量 (ml)	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
理 論 値	200	133	100	80	67
実 測 値	177	128	100	83	67
移 行 率 (%)	89	96	100	104	103

注 (1) 反応液: 200 μ g% 純 B₂ 溶液 (1 ml)+水 (4 ml)+2N-NaOH (5 ml)

(2) 光分解条件: 200 W, 100 V, 30 分, 25°C, 20 cm

反応液 10 ml に対しクロロホルム 10 ml を使用したときを標準にとればクロロホルム量がこれよりも多くなると移行率は実測値が理論値よりも大きくなるため比較的高値を与え, またこれよりも少くなると低値を示している。したがってルミフラビンの移行の際には反応液とクロロホルムとを等量にすることが必要と考えられる。

(V) 反応液中の B₂ 濃度とルミフラビン生成量との関係

反応液中に溶存する B₂ 量を 0.02~3.0 μ g/ml の範囲で種々に変え, 前述の光分解条件下で B₂ 濃度とルミフラビン生成量との関係を検討した結果, B₂ 濃度 0.02~2.4 μ g/ml の間でクロロホルムに溶存するルミフラビン量とそれに対応する B₂ の理論量とが直線関係を示すこ

第 4 表

		38 $\pm$ 0.5				50 $\pm$ 1.0					
処理法	水温 (°C)	38 $\pm$ 0.5				50 $\pm$ 1.0					
	水解時間 (時間)	12	24	36	48	1	3	5	10	15	24
温 水		46	50	58	59	—	—	—	—	—	—
無 糊 化		49	58	60	59	—	49	52	52	—	58
糊 化		51	60	—	—	58	60	60	59	58	58

注 (1) 材料: 水分 15.2% の品種不明の水稲玄米

(2) 処理法:

- イ) 温 水…玄米粉(10 g)+水(50 ml)+2N-HCl(pH→4.5)+トリオール(5 滴)→38 $\pm$ 0.5°C, 12~48 時間
 ロ) 無糊化…玄米粉(10 g)を採取し, 和田・桜井氏らの方法²⁾によってジアスターゼ水解を行った
 ハ) 糊 化…玄米粉(10 g)に水(50 ml)を加え, 2N-HCl で pH 4.5 としたのち湯浴中で糊化させ, 水冷却トリオール(5 滴), ジアスターゼ末(0.1 g)を加えて所定の時間恒温器に入れる。のち取り出して重量補正(加水による)を行い濾過して浸出液を得る

とが知られた。

(VI) 玄米浸出液を用いての光分解時間の検討

わが国において現在一般に用いられているジアスターゼ水解法によって調製した玄米浸出液をアルカリ濃度 0.5 N, 1.0 N の条件下で光分解し, ルミフラビン生成量を経時的にみると第 3 表の通りである。

第 3 表

アルカリ 濃度(N)	時間 (分)	相対値						
		15	30	60	90	120	180	240
0.5	本 検	—	98	100	100	99	93	—
	添 検	—	98	100	100	100	100	—
1.5	本 検	92	98	100	99	98	95	93
	添 検	96	99	100	99	99	96	92

注 (1) 浸出液の調製: 玄米粉(10 g)+水(40 ml)+2N-HCl(pH→4.5)→水(50 ml にする)+トリオール(5 滴)+ジアスターゼ末(0.1 g)→38°C, 24 時間→水(50 ml に補正)→濾過

(2) 反応液: 本検 濾液(4 ml)+水(0.5 ml)+NaOH(4 ml)

添検 濾液(4 ml)+200 μ g% 純 B₂ 溶液(0.5 ml)+NaOH(4 ml)

(3) 光分解条件: 200 W, 100 V, 25°C, 20 cm

第 3 表を見ると玄米浸出液の例ではルミフラビンの生成は純 B₂ 溶液に比して遅く, 光分解 60 分で高値に達し, のち 120 分まで一定している。また 25°C では 0.5 N, 1.0 N の間に差異がなく, 添検も本検同様の傾向にあることが知られる。以上の結果から玄米浸出液を用いる光分解は 25°C では 0.5 N, 60 分が適当と考えられる。

(VII) 玄米の B₂ 浸出法の検討

前述の理由からジアスターゼ水解を無糊化, 糊化の二つについて経時的に検討し第 4 表の結果を得た。浸出以外の操作は前述各項の最適条件によっておこなった。

第4表を見ると 38°C では無糊化、糊化とも玄米に含有される B₂ を充分に浸出するためには 24 時間の水解を必要とするが温水ではさらに長時間を要し 36 時間となつてゐる。50°C では無糊化、糊化の間にかんりの差異が認められる。すなわち無糊化では水解所要時間が 38°C のときとほとんど変わらないが、糊化では 1~3 時間で早くも水解が充分におこなわれ以後 24 時間まで実測値が一定している。しかしながら 50°C 水解は糊化した澱粉の糖化が 3 時間ではなお不充分で水解液の粘度が高く、濾過が困難なため実用には適しない。従つて実際には水解時間 5 時間を採用することが望ましい。

結 論

光分解の条件は前述のように堀田³⁾、佐々木⁴⁾の結果とかなり一致しているがアルカリ濃度、反応温度条件については若干の相異があるように思われる。すなわち純 B₂ 溶液について行つた試験結果を見ると、概してアルカリ濃度が高いとルミフラビンの生成は比較的速に達するが不安定で、低濃度のばあいに較べて温度の上昇によ

つてルミフラビンの破壊される割合が大きく、したがつて実際にはアルカリ濃度 1.0 N は 20°~25°C で、また 0.5 N は 25°~30°C で用いることが必要である。高温でのジアスターゼ水解浸出については McLaren⁵⁾、藤田⁶⁾の報告があるが前述の結果から McLaren の 45°~50°C、15 時間は長すぎ、また藤田の 45°C、1 時間は短かすぎるように思われる。藤田はジアスターゼ水解後 0.25 N-H₂SO₄ を用いてさらに 80°C で 15 分酸分解をおこなつてゐるので水解条件は McLaren のばあいとは異なるが、H₂SO₄ 水解は和田・桜井²⁾の報告にもあるように螢光汚染物が混入するおそれがあり、またこの程度では糊化澱粉の糖化が不充分で水解液の濾過が困難である。したがつて玄米の B₂ 浸出は糊化後 50°C で 5 時間ジアスターゼ水解をおこなうことが望ましい。

以上の結果をまとめて術式で示すと第5表の通りである。定量に使用する器具、薬品の規格は従来採用されているものを用いて支障がない。本法による玄米の総 B₂ 定量値の誤差は ±3.1% (危険率:5%) である。

第5表 玄米の総 B₂ 定量術式

浸 出	玄米粉 (10 g)+水 (50 ml)+2N-HCl(pH→4.5)→湯浴 (糊化)		
	→冷却→トリオール (5 滴)+ジアスターゼ末 (0.1 g)→50°C, 5 時間		
光 分 解	→放冷→水 (50 ml に補正)→濾過 (濾液)		
	本検	添検	標準液
	濾液 (4.0 ml)	濾液 (4.0 ml)	200 μg% 純 B ₂ 溶液 (1.0 ml)
	水 (0.5 ml)	200 μg% 純 B ₂ 溶液 (0.5 ml)	水 (3.5 ml)
	+N-NaOH (4.5 ml)		
	λ (200 W, 100 V, 60 分, 25°C, 20 cm)		
	+氷醋酸 (0.5 ml)		
	4%KMnO ₄ -3%H ₂ O ₂		+水 (0.5 ml)
	+クロロホルム (10.0 ml)		
	約 30 秒強振 → 遠沈		
比 色	クロロホルム層をとり比色		
	↓ F	↓ F'	↓ 100

計算式:

$$B_2 \mu g\% = 10 \left(\frac{12.5F}{F' - F} - D \right)$$

ただし F: 本検の読み

F': 添検の読み

D: ジアスターゼ末 0.1 g に含有される B₂ 量 (μg)

栄 養 と 食 糧

本実験に当り終始御指導をいただいた有山教授に厚く感謝の意を表する。

引 用 文 献

- (1) 藤田秋治: ビタミンの化学的定量法 (1948)
- (2) T. Wada, Y. Sakurai: J. S. R. I., 49, 10 (1951)
- (3) 堀田一雄, 八木国夫, 久保田博凡: ビタミン,

3, 96 (1950)

- (4) 佐々木林治郎, 津郷友吉, 藤巻正生, 岡智: 日農化誌, 28, 20 (1954)

- (5) McLaren, B. A., Cover, S., Peterson, P. B.: Arch. Biochem., 4, 1 (1944)

- (6) 藤田秋治, 松浦寛治: ビタミン, 3, 126 (1949)
(東北大・農・生活科学科)

編 集 幹 事

醫學博士 島 蘭 順 雄	農學博士 稻 垣 長 典
農學博士 櫻 井 芳 人	醫學博士 田 村 盈 之 輔
醫學博士 中 川 一 郎	

「栄養と食糧」誌投稿規定

1. 本誌には栄養, 食糧に関連ある綜説, 報文, 抄録, 記事等を掲載する。寄稿者は本會々員に限る。
2. 報文は刷上り4頁(圖, 表, 寫眞等を含め400字原稿用紙16枚程度)以内とする。この頁數を超える場合は超過分に要する費用(刷上り1頁當り2,100圓)を申受ける。
3. 報文その他の掲載は受理順によるを原則とするが, その採否並に順序は編集會議の判定による。また, 編集會議は原稿中の字句に就て加除修正を行うことがある。なお, 印刷に要する經費の全額(刷上り1頁當り2,100圓)を豫め著者より提出された場合は, 原稿の長短に拘らず, 可及的速かに掲載する。
4. 原稿は平假名交り口語體で横書とし, 數字, 單位符號は cm, cm², cc, mg%, g/dl, 37°C 等と書き, 外國語は明瞭なる歐字又はタイプライターにて記されたい。
5. 表題には歐文譯を附し, 著者氏名にはローマ字をつけられたい。
6. 表と圖は重複しないようにし, 圖と寫眞は明瞭なものを提出されたい。
7. 引用文献は研究事項に直接関連するものにとどめ, 著者氏名, 誌名, 卷數, 頁數(西曆年)の順に記し, 原稿の終りにまとめられたい。
8. 別刷は綜説, 報文に限り30部を贈呈し, それ以上は著者負擔とする。所要部數を原稿頭初に朱書されたい。
9. 原稿は東京都文京区向ヶ丘彌生町, 東京大学農学部農化教室, 櫻井芳人宛送附されたい。

(禁轉載) 栄 養 と 食 糧

發行兼編集者 櫻 井 芳 人
栄 養 ・ 食 糧 學 會 内

印刷者 永 井 直 保
東京都中央区入船町二ノ三

1カ年 會費 700圓 (含誌代)
(會員以外は頒布せず)

印刷所 永井印刷工業株式會社
東京都中央区入船町二ノ三

昭和31年12月25日印刷

昭和31年12月30日發行

(雑誌不著その他に就ては下記發行所へ問合せ下さい)

東京都千代田区神田神保町一ノ三九 第一出版株式會社 電話東京(29局)4576・4577
振替番號 東京 23838 番