綜

説

ビ タ ミ ン B₁ の 化 學 的 定 量 法

DOUGLAS J. HENNESSY

(Fordham University, New York, N. Y.)

Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 216 (1941)

芦 田 淳 譯

(東京帝國大學農學部農藝化學教室)

昭和 17 年 5 月 25 日 受 理

動物試験にては化學的定量法程正確なる値を見出し得ないが故にビタミン B₁ の正確にして且つ短時間になし得る定量法の必要なることは明かである。化學的定量法とは一定の條件でビタミン B₁ より生成される物質の濃度を測定するのであり、如何なる場合でもビタミン B₁ より測定される物質へ完全に變化するものでないが或る濃度範囲では變化の%は一定である。

KINNERSLEY 及び PETERS 法^(15,16), WILLSTAEDT 及び BARANY 法⁽⁴⁰⁾並に PREBLUDA 及び MCCOLLUM の試薬を用ひる MELNICK 及び FIELD 法^(20~24,26) は全てビタミン B₁ とジアゾ化した芳香族アミンとの結合により生ずると推定される色素の比較に基くものである。之等の方法に用ひられた芳香族アミンは sulfanilic acid, 2,4-dichloroaniline 及び *p*-aminocetophenone である。最近 EMMETT, PEACOCK 及び BROWN⁽⁴⁾は MELNICK 及び FIELD 法を簡易化し比較的ビタミン B₁ 含量の多い物質に應用した。

上記以外の反應によるビタミン B₁ 定量法は JANSEN⁽¹⁴⁾により提案された。ビタミン B₁ はアルカリ性に於て赤血鹽により酸化されてチオクロームとなり、紫外線で照射すると強い青紫色の螢光を發し且その強さはチオクロームの濃度に比例する。イソブタノールにてチオクロームを抽出する時は螢光の強さを増すと同時に螢光阻害物質は大部分酸化液中に残される。赤血鹽を加へない盲試験を行つてチオクローム以外の螢光を測定して差引けばチオクロームより發する螢光の強さが出てくる。この方法により JANSEN は尿中のビタミン B₁ を定量した。このチオクローム法はその後種々改良せられたが、中でも HENNESSY 及び CERECEDO⁽¹⁰⁾の方法は優れてゐる。JANSEN⁽¹³⁾, WIDENBAUER⁽³⁶⁾, WIDENBAUER 等⁽³⁷⁾, 及び RITSERT^(3,32)はチオクローム法を血液の分析に用ひ、又尿中のビタミン B₁ も多くの人により定量された^(3,6,11,18,26,30,33,35,38)。尙 HENNESSY 及び CERECEDO⁽¹⁰⁾, WIEGAND⁽³⁹⁾, BERTAGNI⁽²⁾, FLAVIER 及び GENEVOIS⁽⁷⁾はその他種々の物質中のビタミン B₁ をこの方法により定量した。この方法に反對する人もあり、殊に WANG 及び HARRIS⁽³⁵⁾, HILLS⁽¹¹⁾, MALLINCKRODT-HAUPT⁽⁹⁾, OTTO 及び RÜHMEKORB⁽³⁷⁾, HUHN⁽¹²⁾, BAUCKE⁽¹⁾, GAHLEN⁽⁸⁾は缺點を指摘して之に代るべき方法を報告してゐる。

如何なる化學的方法に於ても先づ問題になるのはビタミン B₁ を抽出する方法である。全ての種類の物質に適した完全な抽出法の有無は斷言する事は出来ないが、沸湯浴上で 0.1 N 硫酸と熱する方法が一般に用ひられてゐる。この際唯 1 回の抽出で充分であり特に檢體 1g に對し抽出液 50 cc 以上を必要としないが 15 cc 以下の場合には好結果は得られない。試料を動物試験した結果がその抽出液を化學的に定量した結果とよく一致するのは、動物の消化管内で行はれる吸収と同じ程度に抽出される事を示してをりこのことは多くの物質について證明せられた^(4,10)。

磷酸エステル形の形で存在するものは酵素により分解することが必要であり、通常抽出後に行ふ。Takadiastase, amylase, catarase diastase-Merck, 腎臟 phosphatase 及び酵母 phosphatase がこの分解に用ひられ、最初の 4 つは消化酵素で澱粉質の分解に適してゐる。就中 Takadiastase が最も良く使はれてゐる。精製並に抽出操作の際

遊離のビタミン B_1 とそのエステル性質が違つてゐるためにエステルを分解する必要がある、實際エステル型のは之等の操作中完全に失はれる。試料と其中に含まれるビタミン B_1 の割合が 10,000,000:1~2000 なる場合には化學的定量法を行ふ前にある程度精製の必要がある。

簡単にして効果のある精製法は HENNESSY 及び CERECEDO⁽⁹⁾ の方法である。MELNICK 及び FIELD も大體同様の方法を用ひてゐる。即ち不純物の多い抽出液を合成 Zeolite の Decalco 層を通過せしめるとビタミン B_1 は Zeolite に吸着され、之を KCl 溶液で溶出する。ビタミン B_1 含量多い場合にはこの精製は必ずしも必要ではない。Franconite 等を用ひてゐる歐洲の研究者達は吸着物から完全に溶出することが困難な點、及び赤血鹽濃度を變ずる必要のある點を指摘してゐるが鹽基置換をなす Zeolite の場合にはその缺點は除かれる。MELNICK 及び FIELD は白土の使用は不純物除去の方法としては満足すべきものでないと報じ、RITSERT, WANG 及び HARRIS は尿中のビタミン B_1 をチオクローム法にて定量する際、吸着法の利點は無いと考へ Franconite の使用を省いた。感度の點に於ては比色法は螢光法に比して劣り殊にビタミン B_1 含量が少い場合には誤差が大きい。比色法では檢體中に 5γ 以上を必要とし 20~100γ が定量に適し、螢光法では 0.1γ でも定量することが出来るが 0.5~2.5γ 程度が適當である。螢光計のガルバノメーターはビタミン B_1 0.1γ に付少くとも 5 つの目盛を有つものでなければならない。PFALTZ 及び BAUER の螢光計⁽²⁰⁾ が之に適してゐる。MELNICK 及び FIELD の方法にて生ずる色素を測定するには 2cc の液量が測定出来るものならば普通の比色計か光度計でも差支へない。

兩方法とも誤差範圍は 5% 以内である。比色法中 MELNICK 及び FIELD の方法がビタミン B_1 に對する特異法の點で最も優れてゐる。その化學的説明は PREBLUDA 及び MCCOLLUM⁽²⁹⁾ と MELNICK 及び FIELD⁽²⁰⁾ とでは一致せず、色素の構造も未だ決定されてゐない。ビタミン B_1 と PREBLUDA-MCCOLLUM 試薬との反應にフェノールとアルコールが効果のあることはよく知られてゐるがその説明もついてゐない。MELNICK 及び FIELD はアルコールとフェノールを反應液に添加することにより感度を増し、ビタミン B_1 の分解を防ぎ、吸着物からの溶出を一定にし、色素生成に影響する微量物質の作用を抑制することが出来、又標準液は唯 1 個で充分であつた。最高の呈色には 12 時間以上を要するが、その大部分は最初の 30 分間に生成されるため反應時間を短縮出来る可能性がある。

MELNICK 及び FIELD, EMMETT 及び協同研究者が比較的ビタミン B_1 含量の多い試料を定量した結果は動物試験の値とよく一致した。尙尿中のビタミン B_1 を定量し⁽²³⁾ チオクローム法の結果とも可成り一致した。一方同じく尿中のビタミン P_1 を定量してチオクローム法が MELNICK 及び FIELD 法より平均 15% 多く出たと云ふ報告もあるが、之は 2 つの方法が全然異つた反應に依るためと考へられる。感度の劣る比色法では 75~300cc の尿を要するが、螢光法では僅か 10~20cc で充分である。比色法で大量の尿を用ふ場合に Zeolite から殆んど完全にビタミン B_1 を溶出するためには吸着前 benzyl alcohol にて處理し鹽類を除去して置く必要がある⁽²³⁾。

チオクローム法

チオクローム法の長所は動物試験の結果と誤範圍に比較してあることである⁽¹⁰⁾。チオクロームの化學構造が決定されてゐる故に、反應の化學的根據は明かである^(17,34)。ビタミン B_1 をアルカリ性にて赤血鹽により酸化した時に當量のチオクロームは生成しないが、之が酸化過程に於ける平衡の成立によるものか、或は副反應によるものかは決定されてゐない。しかし適當の條件の下で阻害物質が完全に除かれるならばチオクロームは均一に生成される。ビタミン B_1 の磷酸エステルが酸化された場合には多分チオクロームの磷酸エステルが生成するものと思はれる。3 つのチオクロームの螢光の強さは磷酸の數が増す順序に 12, 15, 19 の割合である。従つてエステルの混合物を直接酸化してその螢光を測定しても眞の値は得られない。

チオクローム法に於てはチオクローム以外の螢光を測定するために赤血鹽を加へない盲試験を行ふが Zeolite を用ひるならば之等の螢光物質は大部分除かれる。赤血鹽により之等螢光物質は部分的に分解される可能性があるため、酸化した場合としない場合の螢光度の差は實際のチオクロームの量より小さくなる。試料及び標準ビタミン B_1 の酸化しない時の螢光の差が試料の酸化した時としない時の差の 10% 以上の場合には之が問題になる。かくの如き場合には赤血鹽により分解されるチオクローム以外の螢光は單にアルカリとイソブタノールとで 5 分間處理するだけで分解するものである。チオクローム法は米國では多くの工業、醫學、並に大學の研究室で用ひ

られ満足すべき結果を得てゐる。一般に使用されてゐるのは HENNESSY 及び CERECEDO 法⁽¹⁰⁾である。その改良すべき點を Am. Chem. Soc. の會合で著者が報告したが、その大要を示せば次の如し。

抽出液の調製 抽出は檢體を單に 0.1 N 硫酸で處理すれば充分である。酵素による分解の最適 pH は 4.0~4.5 であり、鹽基置換には 1/10 容の 1.2 M 醋酸曹達を添加する。

第一法 (直接法) 檢體を酸化する時の KCl の濃度は 20~25% を要する。赤血鹽とアルカリは檢體に加へる前に混じた方がよい。圖の如き遠心分離管を考案した結果酸化、チオクローム抽出、イソブタノール層の分離、清澄等はすべてこの 1 つの管で行ふことが出来る。イソブタノール抽出の振盪時間は 1.5 分が最適と考へられる。次いで 0.75 分遠心分離機にかける。

第二法 (鹽基置換法) 上部は 25 cc 容、中部は 15×0.7 cm、下部は 3.0×0.3 cm の毛細管である (圖参照)。毛細管をガラスウールで塞いで置いて 6~7 cc 容の Decalso を管に詰める。

鹽基置換 鹽基置換は室温で Decalso を 10 分間 10 倍量の 3% 醋酸溶液で振盪することを 4 回繰り返して行ふ。2 回目と 3 回目の間に 15 分間 5 倍量の 25% 鹽化加里溶液にて處理し、最後に水洗する。溶出液は 0.1 N 鹽酸に 25% 鹽化加里を溶かしたものをを用ひ室温で 15 分間に 9 cc を越えぬ程度に 21 cc の上記溶出液を通過せしめる。21 cc を 4 回に分けて行ふとよい。この置換溶出の操作は 16 個ぐらゐ同時に

行ふことが出来、1 試料に付 2 つ宛行ふとして 8 種の試料に約 70 分を要する。

Decalso は繰り返し使ひ得るが實驗毎に新しいものを用ふる方が安全である。

第三法 (酵素分解を行ふ方法) 酵素による加水分解 酵素による加水分解は 0.5% の Takadiastase を加へ pH 4.0~4.5 にて 50° に 2 時間保つ。抽出後引續いて行ふのがよい。

螢光測定 ビタミン B₁ 1 γ に對するガルバノメーターの振れを定めて置くためには硫酸キニンを用ふる方がよい。その際硫酸キノンの螢光は檢體の螢光を測定する直前に測定する。

上記のチオクローム改良法を用ひて HENNESSY 及び CERECEDO⁽¹⁰⁾が定量した試料全部を測定した所同じ結果を得たが、簡單且つ短時間で測定し得る點に於て優れてゐる。尙その他多くの物質を測定した結果は僅かの例外はあるが動物試験の結果とよく一致した。

このチオクローム改良法によると 1 日に約 16 乃至 24 個定量することが出来る。

總 括

ビタミン B₁ の正確にして且つ短時間に出る化学的定量法について説いた。

PREBLUDA-McCOLLUM 試薬を用ひた MELNICK 及び FIELD の比色法はビタミン B₁ 含量の多い物質の定量に用ひられる。ビタミン B₁ 含量の少い物質には比色法より感度の高いチオクローム法が適してゐる。合成 Zeo ite の Decalso を使用すれば呈色阻害物質の除去に効果があり、チオクローム法に之を適用した。

文 献

- (1) BAUCKE, J.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 1128 (1939).
- (2) BERTAGNI, P.: *Boll. soc. ital. biol. sper.*, **14**, 244 (1939).
- (3) BORSON, H. J.: *Ann. Internal Med.*, **14**, 1 (1940).
- (4) EMMETT, A. D., PEACOCK, G., and BROWN, R. A.: *J. Biol. Chem.*, **135**, 131 (1940).
- (5) FERREBEE, J. W.:
- (6) FERREBEE, J. W., and CARDEN, G. A.: *J. Lab. Clin. Med.*, **25**, 1320 (1940).
- (7) FLAVIER, H., and GENEVOIS, L.: *Compt. rend. soc. biol.*, **130**, 497 (1939).
- (8) GAHLEN, W.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 1446 (1939).
- (9) HENNESSY, D. J., and CERECEDO, L. R.: Abstracts of Dallas Meeting Papers, American Chemical Society, April, 1938.
- (10) HENNESSY, D. J., and CERECEDO, L. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 179 (1939).
- (11) HILLS, G. M.: *Biochem. J.*, **33**, 1966 (1939).

- (12) HUHN, O.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 1094 (1939).
- (13) JANSSEN, B. C. P.: *Acta Brev. Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol.*, **8**, 119 (1938).
- (14) JANSSEN, B. C. P.: *Rec. trav. Chim.*, **55**, 1046 (1936).
- (15) KINNERSLEY, H. W., and PETERS, R. A.: *Biochem. J.*, **28**, 667 (1934).
- (16) 同上, **32**, 1516 (1938).
- (17) KUHN, R., and VETTER, H.: *Ber.*, **68**, 2375 (1935).
- (18) MAGYAR, I.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 1157 (1939).
- (19) MALLINCKRODT-HAUPT, A. St. A.: 同上 **18**, 467 (1939).
- (20) MELNICK, D., and FIELD, H.: *J. Biol. Chem.*, **127**, 505 (1939).
- (21) 同上, **127**, 515 (1939).
- (22) 同上, **127**, 531 (1939).
- (23) 同上, **130**, 97 (1939).
- (24) MELNICK, D., and FIELD, H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **38**, 723 (1938).
- (25) MÜLLER, R. H.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **12**, 600 (1940).
- (26) MUKHERJI, A.: *J. Indian Chem. Soc.*, **16**, 273 (1939).
- (27) OTTO, H., and RÜHMEKORB, F.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 645 (1939).
- (28) PREBLUDA, D., and FIELD, H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **38**, 723 (1938).
- (29) PREBLUDA, H. J., and MCCOLLUM, E. V.: *Science*, **84**, 488 (1936).
- (30) RITSERT, K.: *Deut. Med. Wochschr.*, **64**, 481 (1939).
- (31) RITSERT, K.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 852 (1939).
- (32) 同上, **18**, 1370 (1939).
- (33) SCHNEIDER, E., and BURGER, A.: 同上, **17**, 905 (1938).
- (34) TODD, A. R., BERGEL, F., FRAENKEL-CONTRAT, H. L., and JACOB, A.: *J. Chem. Soc.*, **1936**, 1601.
- (35) WANG, Y. L., and HARRIS, L. J.: *Biochem. J.*, **33**, 1356 (1936).
- (36) WIDENBAUER, F.: *Klin. Wochschr.*, **18**, 1392 (1939).
- (37) WIDENBAUER, F., HUHN, O., and WISSELHOFF, V.: *Zentr. inn. Med.*, **60**, 113 (1939).
- (38) WIDENBAUER, F., HUHN, O., and ELLINGER, R.: *Z. ges. exptl. Med.*, **105**, 138 (1939).
- (39) WIEGAND, J. A.: *Arch. neerland. physiol.*, **23**, 281 (1938).
- (40) WILLSTAEDT, H., and BARANY, F.: *Enzymologia*, **2**, 316 (1938).