

13

ビタミン B₁ の比色的定量法に就て(動物組織定量の場合の簡便法とキシロール移行性色素ある
動植物組織の場合の前處置法)

藤 田 秋 治 松 川 男 兒

(北里研究所生化学室)

我々は既にビタミン B₁ の比色的定量法に就て詳細を發表したが、動物組織の場合に浸出液を濃縮してメタノール法、またはベンチルアルコール法を行ふ處置は稍繁瑣であるから、これをもつと簡易化する事を企てた。實驗の結果、動物組織の場合にも直接吸着法の適用し得る場合の少くない事と、醋酸アミル或はイソブタノールによる豫浸法を行ふ事により、簡単に直接吸着法に導き得る場合の少くない事を知つた。また色素に富む植物組織及び動物組織の或るもの(例へばカキの如き)に於ても豫浸法は満足すべき成績を與へる事を知つた。次に今日迄の實驗の結果適當と思はれる方式を報告する。

1) 尿の場合の定量

方式 尿 50.0 cc をとり pH を補正して約 4.5 とし (添加實驗では更にこれに 40 γ の B₁ を加へる)、これにイソブタノール (或は醋酸アミル) 10 cc を加へ、80°, 5 分加熱の後 2 分間振盪し、冷却の後遠心沈澱する。上層は通常赤褐色を呈する。ピペットを用ゐて上層及び中間層を貫通して下層のみをとり、イソブタノール (または醋酸アミル) にて再び同様の豫浸を行ひ、下層をとり水を加へて 500 cc とし²⁾、珪藻土 0.4 g を加へて振盪の後濾過し、水洗の後殘渣をとり方式の如く B₁ を定量する。

備考 (1) 豫浸法を行はないと尿ではキシロール層が板狀となり測定不能であるが、この處置により測定に支障がなくなる。

1) 藤田, 松川, 日本醫學. 3251, 5, 1941; *J. Bioch.* 33, 385, 1941.

2) この稀釋法を行はないと尿の場合は、呈色阻害現象が著しく (約 60% 阻害) 且つキシロール層に黄色色素が移行する。

(2) f 値は 180 乃至 220 位である。醋酸アミルの方が f 値が通常 10% 位低いやうである。

(3) 豫浸に當り 10% の割に芒硝を加へると上の如く行つても呈色の阻害が起る(約 30% 位)。

(4) 尿は(豫浸後でも)これを氷室内に一夜放置する時または寒冷時室内に放置する時往々に赤褐色の沈澱を生ずる(褐染せる尿酸結晶であらう)。これを混じた珪藻土吸着物を用ひて呈色反應を行ふと、呈色が著しく阻害される事があるから、吸着に先だち豫め濾過して沈澱物を除いて置く必要がある。

2) 動物組織の場合の遊離型ビタミン B_1 の定量

遊離型定量の場合は組織内磷酸酵素の作用を除くために、まづ次の如く酵素の不活性化を行つた後浸出を行ふ。(この點は植物組織の場合にも同様に必要である)。

方式 水の適當量を豫め 80° に加熱して置き、これに組織片 $m g$ を投じ 80° , 15 分加熱の後、組織を出し、硝子小片を加へて十分に乳鉢内で磨碎する。これに上の水浸液 HCl の適量及び更に水を加へ全量を $5 m cc$, pH を約 4.5 とする。更に 80° , 15 分間加熱して(この間時々振盪), B_1 の浸出を行ふ。浸出液は加熱後は大抵略透明となる。冷却の後減少水を補ひ、遠心沈澱して上清をとる。これにより浸出液 (1:5) を得る。

更に植物組織の場合の如くこの液に直接吸着³⁾を行ふ時多くの場合定量の目的を達するものであるが、時としてキシロール層が板狀となり測定不能となるものがある(例へば牛肝臓、鶏肉の如き)。またキシロール層に少しく板狀物を生じ、キシロール層の分離の不十分なるものもある(例へば牛睾丸、牛心筋の如き)。後者の場合はキシロール層及び板狀部を、小遠心管(徑約 1.8 cm)に入れ栓をして再び遠心沈澱すると、所定量のキシロール層を採取する事が出来る。前者の場合は今日の處適當なる対策なく、我々のメタノール法(またはベルチールアルコール法)による外はない。

備考 (1) 脂肪の多い組織では浸出液を遠心分離すると表面に脂肪が浮遊する。定量にはピペットにて下の水層のみをとり脂肪を避ける。

(2) 獸鳥肉、或は牛胃腸の如く磨碎の困難なるものは 80° 加熱後組織片を鉄にて細切した後硝子小片を加へて磨碎すればよい。

3) 尿の如く稀釋して吸着を行ふ必要はない。

(3) 動物組織の直接吸着法に於ても、添加 B_1 量と E 値とはよく正比例するものである。(40 γ 迄實驗)。

3) 動物組織の場合の總ビタミン B_1 の定量

タカヂアスターゼを作用せしめたる後には、これ迄の處動植物を通じ、多少の例外はあるが大抵の組織では直接吸着法が可能であつた。但しキシロール移行性色素ある時には上述の豫浸法を行ふ必要がある⁴⁾。酵素液は實驗の便宜上全體の液容をあまり増さないために我々は 10 倍液 1 cc を用ゐる事にして居る。38°, 一夜放置の後絮狀沈澱物が出来るものがあり、(脾臓、心筋、骨骼筋、肝臓、魚肉の或るものその他一般に浸出液の濁濁してゐるものに多い) またものによつては液の表面に浮游物を生ずるもの(主として脂肪類)もある。かゝる場合には、まづ遠心沈澱又は濾過により、これ等の析出物を除去した後に吸着を行ふ⁵⁾。

4) キシロール移行性色素のある組織の定量に於ける前處置

かゝる場合は既に發表した如く、珪藻土吸着の後にイソブタノール豫浸法を行つてもよく目的を達するが、吸着前に豫浸法を行ふのが都合がよい。例へばエンジンにては次の如く行ふ。

エンジン水浸液 (1:5) 50 cc をとり (可なり濁濁し黄橙色を呈する) これに醋酸アミル 10 cc を加へ、80°, 5 分加熱の後振盪し、遠心沈澱し水層をとり、豫浸法を 2 回反復の後水層 (最早黄色はない) をとり、珪藻土 0.4 g. を加へて振盪し、沈澱をとりて方式の如く定量する。

ハウレンサウその他の緑葉に於ても、同様の豫浸法 (通常 1 回で足りる) を行ふ。動物組織ではカキの如く水浸液が黄色を呈し、濁濁せるものでは同様イソブタノール または 醋酸アミルの豫浸法を行ふ必要がある。

[詳細は J. Biochem. に發表する]

(受附: 昭和 16 年 11 月 19 日)

4) 牛肝臓ではキシロール層に多少板狀物が出来るが、豫浸法を行へば大抵目的を達する。

5) 稀釋することなく直接吸着する。