

吸着劑による Vitamin B₁ の吸着及び誘出に就て

藤 田 秋 治 沼 田 勇 松 川 男 兒

(北里研究所生化学室)

動植物組織中の Vitamin B₁ の定量には往々之を一旦吸着劑に吸着せしめ Vitamin B₁ 以外の物質を可及的除去する必要があるが、これがためには當研究室では珪藻土が最も適當である事を始めて指摘し再三之を強調して來た。¹⁾ 又從來最も多く用ゐられて來た Fullererde, Frankonit, 酸性白土等は少くとも我々の實驗した製品では吸着、誘出が珪藻土に比して劣る事を報告した。この點は最近の佐藤等²⁾ の實驗に於ても確かめられて居る。珪藻土は燒灼又は鹽酸加熱等の處置を経ないものならば、我々の實驗した數種の製品³⁾ は何れも同様に満足なる成績を示した。昨年10月10日厚生科學研究所で開かれた Vitamin 研究會席上の話により酸性白土は産地によつて吸着能の良否に可なりの差違のあること及び珪藻土にも吸着能の不良なるものゝあることを知つた。それで種々の吸着劑の吸着及び誘出能について稍詳しく比較研究を行ひ、我々の用ゐて居る珪藻土の吸着能についても改めて検討して見た。次にその成績の要點を報告する。

B₁ 吸着率の比較 吸着能の比較は次の如く行つた。適當濃度の B₁ 液 5.0 cc に水を加へて約 30 cc とし之に種々の吸着劑を夫々 0.2g づつ加へ 2 分間硝子棒にて攪拌した後遠心沈澱して上清の一定量をとり水を加へて 20 cc とし、芒硝 6g を加へ十分に溶解せしめたる後⁴⁾ 0.1% Ferri 液 0.2 cc, 30% NaOH 液 5 cc を加へ 2 分間振盪、Isobutanol 6.0 cc にて 2 分間強く振盪、遠心沈澱して上層 5.0 cc をとり方

1) 藤田, 松川: 東京醫新. 3188, 1, 1940; 藤田, 淺利, 土肥: 日本醫學. 3244, 8, 1941; 藤田, 松川: 日本醫學. 3251, 5, 1941.

2) 佐藤, 平野, 瀧野, 彌地: 熱帯農學雜誌. 13, 267, 1941.

3) 實驗したのは武田化學及び小島の製品數種であつた。

4) 不溶部分があつても差支ないから熱々加熱溶解する事はしなかつた。

式の如く Thiochrom 法により測定した。一例を次に示す。

4 mg% B₁液 5cc (200 γ B₁含有) 使用。珪藻土にて吸着。上清液 2.0 cc をとる。Thiochrom 液 5.0 cc をとり滴定。滴定量: 0.290 cc (0.270-0.310)。盲験値: 0.030 cc (0.020-0.04)。従つて 30cc 中の B₁ 量は

$$(0.290 - 0.030) \cdot \frac{6}{5} \cdot \frac{30}{2} = 5.17 \gamma$$

不吸着率: $\frac{5.17}{200} \cdot 100 = 2.6\%$ 。従つて吸着率: 97.4%

珪藻土及び酸性白土 (理研) の實驗に於て吸着劑と B₁ 液と振盪する時間は 2 分でも 30 分でも吸着の程度は同一で 2 分以上振盪しても吸着の程度は増大しなかつた。實驗に使用した吸着劑の種類は次の如くである。

1. 珪藻土(武田化學)。
2. 酸性白土, 白色(理研)⁵⁾。
3. 酸性白土, 帶黃褐色(武田化學)。
4. 酸性白土, 帶赤褐色(製造所不明)。
5. Adsol, 理研, 乾燥用(小島)⁶⁾。
6. 乾燥用 Adsol (小島)⁶⁾。
7. 5 を瓦斯焔にて 1 時間灼熱したもの。
8. 6 を同様に灼熱したもの。
9. Frankonit KL, 白色 (Fraenkel)。
10. Kaolin (Merck)。
11. Bolus alba pulvis subtilis (Merck)。
12. Permutit, ammoniakfrei gepulvert (Fraenkel)。
13. 曹達ピユアライト (artificial Zeolite), 硬水軟化用 (東京パームチット商會)。
14. 珪藻土(Kieselgur mit Säure gewaschen und geglüht, Fraenkel)。
15. Fullererde, braunrot (Fraenkel)。
16. Fullererde(灰白色顆粒, Fraenkel)。
17. Asbestpulver (Fraenkel)。

B₁ 液は夫々 20, 4, 0.8, 0.16 mg % 液 5cc を用ゐた。B₁ の絶對量として夫々 1000, 200, 40, 8 γ に相當する。此の水溶液は表 1 に示す如く夫々 pH 4.6 乃至 5.6 であり、珪藻土の吸着の至適 pH は我々の比色法による測定では 2 乃至 6 の間にあり、且つその間では殆ど差違がなかつたので(藤田, 松川⁶⁾)、先づ緩衝液を用ゐずに行ひ各種吸着劑の吸着能の大小の大體の見當をつけた。その成績を見ると珪藻土に於ても B₁ 量を多量に用ゐると吸着上清中に B₁ を明に證明した⁷⁾。然し吸着率からいへば 1000 γ の時でも 95% に過ぎず殆んど實驗誤差範圍内に在ると見てよい程度である。酸性白土(2)に於ては B₁ 量 1000 γ の時は吸着は 99% に達するが B₁ 量の小なる程吸着率は劣つて居た。即ち酸性白土による吸着は珪

5) 理研櫻井芳人氏より贈られたもの。茲に氏の御厚意を深謝する。

6) 乳鉢にて粉碎して使用。

6) 東京醫新. 3188, 1, 1940.

7) 比色法では感度が Thiochrom 法に比して著しく劣る。我々の前報では比色法で上清の呈色なき事より吸着完全と記載したのである。

藻土に比しpHの僅かの違ひにより影響される事が大であると思はれた。其他 Adsol 及び Frankonit も吸着率は良好であつた。pHの差違を除くため、更に吸着率の良好なるものにつき前述の條件で、只吸着に際しB₁液 1.0 cc, m/20 醋酸緩衝液 (pH4.5) 6 cc, 水 23 cc を用ゐて實驗した結果

表 1

數字はB₁の吸着率(%)を示す。

括弧内は pH4.5 の緩衝液を用ゐたる場合を示す。

使用B ₁ 量(γ)	1000	200	40	8
B ₁ 液のpH(比色)	4.3	5.2	5.5	5.6
珪(1)	95.2	98.7(99.3)	98.1(99.2)	99.1(99.6)
酸白(2)	99.4	97.4 (100)	94.2 (100)	87.7 (100)
酸白(3)	96.2	90.2(99.5)	51.7 (100)	86.8 (100)
酸白(4)	98.3	98.5 (100)	98.6 (100)	97.1 (100)
Adsol(5)	96.5	99.0	96.3	96.5
Adsol(6)	97.7	89.0	93.9	95.5
Adsol(7)	97.0	99.7(99.4)	99.0(99.2)	98.4(99.3)
Adsol(8)	97.0	99.5(99.2)	99.5(99.2)	99.3(99.3)
Frankonit(9)	99.3	99.5 (100)	97.7(99.5)	96.2(99.6)
Kaolin(10)	93.2	97.2(99.5)	94.9(99.1)	93.3(99.3)
Bolus(11)	97.7	92.6(99.6)	91.7(99.2)	56.0(98.9)
Permutit(12)	54.3	74.9	87.8	82.9
珪(14)	35.4	59.7	90.4	95.3
Fullererde(15)	83.4	74.4	91.2	92.8
Fullererde(16)	91.5	93.8	94.0	85.6
石綿粉(17)	68.7	91.0	94.0	94.0
Permutit(12)*	33.7	85.8	88.4	65.7
Permutit(13)*	33.6	75.3	83.9	24.2

* 本文参照

は表1の括弧内の數字の示す如く、實驗した9種の吸着剤は何れも吸着率極めて高く實用上殆ど完全といつてもいい程度であつた⁸⁾。Permutitは其のまゝでは吸着能はあまりよくないといふから一部はHennessy⁹⁾等

8) 緩衝液なき場合は吸着後の上清に多少の乳濁のあるものがあつたが、緩衝液の場合は何れも全く透明となつた。

9) Hennessy, Cerecedo: *J. Amer. Chem. Soc.* 61, 179, 1939.

に従つて先づ此の中の過剰の油を除きK型にかへる爲に次の如く行つた。

Permutit を粉碎し先づ2%醋酸を煮沸してその 15cc を加へて振盪すること 4 回の後 25%KCl の煮沸したものを 15 cc にて振盪すること 4 回の後煮沸水 15 cc にて洗滌すること 3 回、遠心沈澱の後そのまま吸着に用ゐた¹⁰⁾。表 1 中*のあるのはかかる前處置せるものを用ゐた成績である(吸着の際にも 100°, 5 分加熱した)。

表に見る如くかかる面倒な處置を行つても B₁ の吸着は我々の材料では不完全で未處置のものより却つて不良であつた。

B₁ 誘出率の比較

上述の如く吸着だけからいへば實用上吸着完全と思はれるものがかなり得られたがこれらが何れも完全誘出を示すであらうか。定量上に應用するにはこの點が確實でなければならない。

實驗は次の如く行つた。B₁ 液 1.0 cc (0.5γ含有) に水を加へて 30 cc とし之に吸着劑各 0.2g を加へ 2 分間振盪の後、遠心沈澱し、沈澱に芒硝飽和液 3 cc を加へ混和の後 0.1% Ferri 液を夫々 0.05, 0.1, 0.2cc 宛加へ混和の後 30% NaOH 1.0 cc を加へ 2 分振盪の後 Isobutanol 6.0 cc を加へて 2 分振盪。遠心沈澱の後 Isobutanol 層 3.0 cc をとり更に Isobutanol 2 cc を加へて螢光測定を行つた。

此場合 0.1% Ferri 液の量によつて檢出率が異なる。なほ盲驗に螢光があるから之を補正する必要がある。珪藻土の場合 Ferri 量と B₁ 檢出率との關係は次の如くであつた¹¹⁾。

0.1% Ferri 0.05 cc 80%, 0.1 cc 82%, 0.2 cc 78%, 0.4 cc 74%, 0.8 cc 74%, 1% Ferri 0.2 cc 72%. 0.1 cc の時の滴定値: 0.235, 盲驗値: 0.035, 補正值: 0.200cc, 理論値 0.250cc.

何れの吸着劑も盲驗値 0.01-0.02cc を示したから之を補正して檢出率を求めた。

結果は表 2 によつて明なる如く吸着率に於て實用上完全であるものも誘出率に於て必ずしも完全ではない。上述の條件下では珪藻土が最も檢

10) 此時 Permutit は乾燥の時の約 3 倍の重さになるから秤量の際は 0.6 g を用ゐた。

11) 吸着物について Isobutanol 豫浸法を行つても、殆んど認むべき損失はなかつた。

12) 藤田、松川の最初の報告(東京醫新, 3188, 1, 1940)に於て珪藻土に於ける B₁ の吸着、誘出が完全であると記載したのは Thiochrom 法による實驗から此の盲驗を補正しなかつたためである。補正すれば檢出率は約 80% になるのであつた。

出率が高いが 100% といふ譯には行かず約80%であつた¹²⁾。其他は何れもこれより低かつた。殊に Adsol の如きは吸着率からいへば極めて優秀であるが誘出率の點で甚だ不良である。

誘出の良否は實驗條件によつて異なるから、B₁ の比色的定量法の場合各種の吸着剤を用ゐると如何なる關係を示すかを知る爲に藤田、松川法¹³⁾ と櫻井改良法¹⁴⁾ とについて比較研究を行つた結果は表 3 に示す如くである (20% B₁ にて實驗。吸着せざる場合の E 値を 100 として表はす)。

表 2

表 3

吸着劑種類	0.1% Ferri 至適量(cc)	檢出率 (%)	吸着劑種類	藤田, 松川法	櫻井法
珪(1)	0.05-0.1	82	珪(1)	85	90
酸白(2)	0.1 -0.2	60	酸白(2)	35	69
酸白(3)	0.1 -0.2	40	酸白(3)	46	69
酸白(4)	0.05-0.2	63	酸白(4)	49	77
Adsol(7)	0.05-0.2	4	Adsol(7)	60	75
Adsol(8)	0.05-0.2	4	Adsol(8)	67	67
Frankonit(9)	0.05-0.2	44	Frankonit(9)	57	63
Kaolin(10)	0.05-0.1	64	Kaolin(10)	49	77
Bolus(11)	0.05-0.2	64	Bolus(11)	46	75

表に示す如く藤田、松川の比色法の方式では珪藻土に比して他の吸着劑では概して檢出率が可なり低いが、櫻井法によれば珪藻土以外は大體何れも略同程度の檢出率を示し此の場合にも珪藻土の檢出率が最も高かつた¹⁵⁾。何れにせよ100%の誘出率を示すものはないが B₁ 量が違つても夫々一定の誘出率を示すものであるから B₁ 定量の上ではその點を顧慮すればどの吸着剤を用ゐても差支ないであらう。然し檢出率の最も高い珪藻土は何れの場合に用ゐても好都合であると考へる。

櫻井改良法は我々の實驗によると10乃至80% B₁ の實驗で大體±10%の誤差範圍でよく比例し、20%で實驗すれば約±4%の範圍で一致する。室温10°乃至30°の間

13) 日本醫學. 3251, 5, 1941.

14) 理研報. 20, 281, 1941.

15) 誘出に際し櫻井法では60%酒精を用ゐるため珪藻土以外でも誘出が可なりよくなるものと思はれる。

に於ても E 値に認むべき影響なく、試薬も安定であり操作も容易であるから慥に良法といふことが出来る。但し f 値は生物組織の場合常に一定ではないから確實なる定量の爲には我々の方式に示した如く添加実験によつて f 値を毎回求めるが至當であると思ふ。尙同法は尿の場合には用ゐ得ない。Xylol 層の板状となることはないが B_1 を添加した場合にも呈色しない。其他の場合は我々の行つた若干の実験に於て藤田、松川法と大抵同一定量値を與へ、一般に用ゐて良法であると思ふ。Xylol 層の板状となることは少い。又藤田、松川法で Xylol 層の呈色に痕跡の黄味のある場合（これは測定には差支ない）にも美しい紫赤色を呈してこの點は甚だよい。只 Xylol 層が放置すると潤濁し易く濾過の必要が起ることがある。

要約

諸種の吸着剤で試験するに B_1 の吸着は完全に 100% といふものはないが實用上完全といへるものは可なりある。然し誘出が完全なるものはない。誘出は條件によつて違ふから一概にはいへないが我々の螢光法、比色法ともに珪藻土以上の B_1 検出率を示すものはなかつた。珪藻土は櫻井改良法に用ゐても甚だよい。同法では酸性白土その他の類似品で同様に用ゐ得るものが可なりある。尙櫻井改良法は生物實驗に用ゐても良法であると思はれる。これに對して二三の卑見を加へた。

(受附：昭和 17 年 1 月 26 日)