

P—アミノアセトフェノンに依るチアミンの 比色定量法に関する知見及び新定量法

水 野 信 雄

Note on the colorimetric determination of thiamine and new determination method by means of P—Aminoacetophenon reaction

by

Nobuo MIZUNO

緒 言

チアミンの定量法には化学的方法として比色法と蛍光法がある。著者は従来比色法を主として用いており、既に比較的容易な方法でのチアミンの定量法を發表した¹⁾。元來チアミンのジアゾ試薬による定量方法は多くあり^{2) 3) 4) 5) 6)}中でも佐藤氏等は反応中に窒素ガスを使用してアルカリ性におけるチアミンの酸化を防止して正確な定量法を報告している。しかしその報文では、呈色の最適温度や反応時間、試薬の添加順序、攪拌方法等については検討していない。著者はこれ等の諸条件を比較検討して、試薬相互間の関係や至適条件を明らかにし、アルコール・フェノールの作用はアルカリ性におけるチアミンの分解阻止にある事を見出して、この作用は無機両性化合物においても充分行なわれる事を見出したので、この点についても併せて報告する。尚これ等の至適条件下で窒素ガスの使用を行なえばジアゾ試薬による呈色は最高になるのでこの点についても報告する。尚この点に関しては pH が 7 以上の生体内でアルカリ性に対して不安定なチアミンが安定に存在して生理作用を営んでいる 1 つの理由になるのではないかと考えられ、興味を引く事実である。

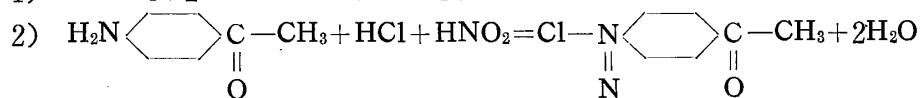
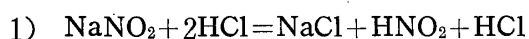
実 験 の 部

I) 試薬の安定性について

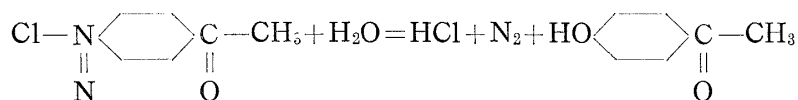
試薬の安定性については諸氏の報告^{2) 3) 4) 5) 6)}で述べてあるが、これ等はすべてジアゾ試薬の有効時間についてであって、試薬添加の際の各試薬とジアゾ試薬との関係について論及したものは少い。これについて次の実験を行った。

そもそもジアゾ試薬は極めて不安定なもので氷冷しておいても N₂ および HCl を出して分解する。この分解作用は高温においては極めて迅速である。尚ジアゾ化は低温で行なうを原則とする。けだし低温ではジアゾ化が遅いが分解が阻止せられるからである。

P—アミノアセトフェノンのジアゾ化およびジアゾ試薬の分解は次式に従って行なわれる。
ジアゾ化



分 解



以上のジアゾ試薬は NaNO_2 、P アミノアセトフェノンの何れかがことごとく消費されればジアゾ化が行なわれない訳であるから効力がなくなる。

a) 温 度

ジアゾ試薬は高温に放置すると分解する。それを検するため以下のごとき実験を行なった。ジアゾ試薬を調製後⁶⁾(佐藤氏法のごとくして)それを一定温度に一定時間放置した後佐藤氏法の第一報⁶⁾のごとくして発色せしめて、比色度を比較した結果を第1表にまとめた。但し $B_1 20\gamma$ としてある。

第 1 表

温度 \ 時間		1	3	5	7
氷	室	0.23	0.23	0.23	0.23
	30°C	0.23	0.19	0.19	—

普通定量する際には最高室温でも30°C位であるから、1時間たっても変化しなければ実用には差支えない事がわかる。

さらに50°Cに一定時間放置したものによって定量してみれば第2表のごとくなる。

第 2 表

時 間	5 分	10 分	40 分
吸 光 度	0.23	0.18	0.18

この際ジアゾ試薬は黄色に変色し明らかに変化を示している。

以上の結果よりすればジアゾ試薬はできるだけ低温に保存する方がよい。

b) 振とうによるジアゾ試薬の分解

ジアゾ試薬は振とうによって分解を促進される筈である。それを検するため以下の実験を行なった。

佐藤氏法のごとくして調整したジアゾ試薬を褐色小瓶に入れて、振とう機で一定時間振とうした。(30°Cで)その後、同法によりチアミンを発色させて、その吸光度を検した。その結果を第3表に示す。

第 3 表

振とう時間	1 分	10 分
吸 光 度	0.23	0.23

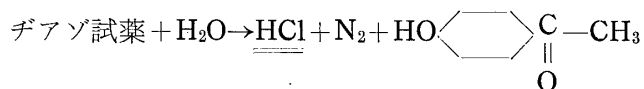
結果は10分以内の振とうなら安全である。

c) アルカリ性にしたジアゾ試薬の安定性

ジアゾ試薬は常温でも3時間置けば 20γ のチアミンの定量にも不十分な位分解する。アルカリ性では

1. 亜硝酸が生成されない。
2. デアゾ試薬が分解される際に生ずる HCl が NaOH と化合する為反応が急に進み分解が

促進される。



以上の2点から分解が進み安定度が低下する筈である。これを検する為に以下の実験を行なった。

遠心分離管に可検液5 ccとフェノール、酒精混液1 ccおよび水2 ccをとり、細管を入れてこれから窒素ガスを通じつつ5分間充分に混和した後密栓する。これを1液とする、

別に試験管に0.5NのNaOH5 ccをとり、4分間窒素ガスを通じた後密栓する。これを2液とする。

さらに別の試験管にジアゾ試薬約5 ccを入れ窒素ガスを4分間通ずる。これを3液とする。

3液よりジアゾ試薬2 ccをとり、これを2液に加えて10分間振とうする。この液を1液に加えてすぐ密栓して1時間放置後佐藤氏⁶⁾法のごとくして吸光度を検した。その結果吸光度は振とうの程度で異なるが、何れも吸光度は低下する。その結果を第4表にまとめた。(20γ)

第 4 表

振 る 程 度	普 通	稍 々 強	強
吸 光 度	0.19	0.18	0.10

結局ジアゾ試薬をアルカリ性として振とうする事は不可なる事を知った。

以上の結果を総合して、ジアゾ試薬は調整後使用前迄なるべく氷室内に貯蔵する事および今迄の報告のごとくアルカリ液を加えて窒素ガスを通ずる時はジアゾ試薬の分解を促進するから、窒素ガス処理はアルカリおよびジアゾ試薬別々に行なって、可検液の部にアルカリ、ジアゾ試薬の順で添加する方が安全である事を知った。

なお可検液と試薬混合後窒素ガスを通ずる事はアルカリ性ジアゾ試薬をフェノール、酒精混液と普通の程度より稍々軽く振とうする意味になり不可であるから避けた方が好ましい事を知った。

d) フェノールまたは酒精のジアゾ試薬(殊にアルカリ性)の安定度におよぼす影響について遠心分離管に可検液5 ccと水2 ccをとり細管を入れて、これから窒素ガスを通じつつ5分間充分に混和する。別に試験管にジアゾ試薬2 ccを加え、1分間窒素ガスを通じたものに既に95%の酒精(または2.5%のフェノール)1 ccを加えて密栓し、1分間振とうしたものを先の可検液に加えて混和後定法のごとくして吸光度を検した。その結果を第5表にまとめた。

第 5 表

添 加 物	酒 精	フェノール	混 液	検 定
吸 光 度	0.11	0.15	0.14	0.23

以上の結果よりすれば、フェノールまたはアルコールはジアゾ試薬の安定剤として作用せず、むしろその有するOH基とジアゾ試薬のジアゾ基との間に縮合を起してこの呈色を阻止するのではないかと考えられる。

II) 発色最適温度及び最適温度において最高発色に達する時間について

a) 最 適 温 度

本反応は Melnick³⁾ 等が認めるごとくチアミンの分解によるチアゾール体とジアゾ試薬の

ジアゾ基との間で行なわれる反応であると考えられるが、この反応を迅速に行なわせる条件として相当の温度が必要な筈である。然るに一方においては高温殊にアルカリ性においては、既述した様にジアゾ試薬の分解が促進される。チアミンも Melnick³⁾ が認めた様にアルカリ性で分解する(その程度は後述する)。そこで縮合反応を速かに完了せしむるに必要で充分であるが、それと同時にできるだけチアミン及びジアゾ試薬を分解しない温度を見つけて呈色を最高に達せしめなければならない。

Melnick はフェノール酒精混液の存在しない場合においては、0°C~5°C で反応させれば、常温で反応させる場合に比してジアゾール核の分解によるチアミンの分解は70%阻止されると述べている。この点に関してはチアミンの安定性の項で述べるが、ここでは常法でチアミンを定量する際の温度及び最高呈色に達する時間を求めるため以下の様な実験をした。

定量法は佐藤氏法其の儘の方法と大体同じであるが、1)のジアゾ試薬の安定度について述べた諸事項よりしてアルカリとジアゾ試薬を混合しない事にした。以下にその要点を述べる。

遠心分離管に可検液 5 cc とフェノール酒精混液 1 cc および水 2 cc をとり、細管を入れてこれから窒素ガスを通じつつ 7.5 分間充分に混和する。窒素ガス処理が済めば密栓して恒温槽に入れて下表のごとき一定温度にする。また試験管に 0.5N の NaOH 5 cc をとり 5 分間窒素ガスを通じた後可検液と同様に処理する。両方の液の温度とも一定になれば可検液にアルカリを加えて手早く軽く振とうし、両液を混合した後(約10秒)速やかにジアゾ試薬 2 cc (あらかじめ氷冷して窒素ガス処理をしておいたもの)を加える。この際温度の低下は 1~2°C で 10 秒以内にもとに戻るので大勢に影響はないと考えられる。混合後窒素ガスを通ずる事なく 1 時間放置常法のごとくして吸光度を測定する。結果を第 6 表にまとめる。

第 6 表

温 度	10°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	50°C	60°C
吸 光 度	0.17	0.20	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23

以上の結果よりすれば、呈色最適温度は 25°C~50°C で割に範囲が広い。室温の高過ぎる心配はないが、冬には温めて反応させる必要がある。また室温が高過ぎればチアミンおよびジアゾ試薬の分解のおそれがあるので 25°C~30°C で行なえば最もよいのではないかと考える。

b) 最高発色に達する時間

a) で最適発色温度が 25°C~30°C である事を知ったので最適温度において最高発色に達する時間を求めるために以下の実験を行なった。方法は a) と同様であるがジアゾ試薬添加後 キシロール添加までの時間を変化させるのである。その結果を第 7 表にまとめた。

第 7 表

時間 温 度	5分	10分	20分	30分	40分	50分	60分
10°C	0.10	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
20°C	0.17	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
30°C	0.20	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
40°C	0.20	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
50°C	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
60°C	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22

その結果によれば最高呈色に達するには10分間で必要で充分であり、藤田氏の述べる様に反応は1分以内に終了するのでもなければ、また Melnick³⁾ の述べる様に24時間かかるのでもない。著者は30°Cで呈色させ試薬添加後15分でキシロールを加える事とした。

Ⅲ) チアミンの安定性について

Melnick 等はチアミンは熱およびアルカリによってチアミンのチアゾール核が開裂してジアゾ試薬と反応しなくなると述べている。

また Barger⁷⁾ 等はジアゾ試薬と結合するのはピリミジン核の free のアミノ基であるが、チアゾール核が開裂するとこの基が存在しなくなり、従って呈色しないのだと述べている。またアルカリ性における酸化でもピリミジン核の free のアミノ基が存在しなくなるのでやはり呈色しなくなる。それで定量に用いる程度のアルカリ性で酸化とチアゾール核の分解がどれ程行なわれるかと云う事を検した。

a) 温度に対する安定性

既報のごとく熱に対しては割に安定であって定量に際しては何等影響はない。

b) アルカリ性におけるチアミンの安定度

イ) フェノール酒精混液の存在しない場合

アルカリ性におけるチアミンの分解速度はフェノール酒精の存在によりある程度阻止されると考えられるので以下の実験を行なった。

遠心分離管に可検液 5 cc と水 3 cc をとる。別の試験管に 0.5N NaOH 5 cc をとり、両液とも 30°C の恒温槽につけて温度が 30°C になった後この両液を混合する。混合後次表のごとき一定時間を経た後フェノール酒精混液 1 cc ディアゾ試薬 2 cc を添加し 30°C の恒温槽中に 20 分放置後常法のごとくして吸光度を測定した。その結果を第 8 表にまとめた。

第 8 表

放置時間	5 分	10 分	20 分	30 分	60 分
吸光度	—	0.03	0.03	0.03	0.03

但し、チアミン 15 γ である。20 γ では 0.04

ロ) フェノール酒精の存在する場合

遠心分離管に可検液 5 cc とフェノール酒精混液 1 cc および水 2 cc をとる。別の試験管に 0.5N NaOH 5 cc をとり両液とも 30°C の恒温槽につけて温度が 30°C になった後、この両液を混合する。混合後下表のごとき一定時間を経た後試薬を添加し 30°C の恒温槽中に 20 分放置後常法のごとくして吸光度を測定する。その結果を 9 表にまとめた。

第 9 表

放置時間	5 分	10 分	20 分	30 分	80 分
吸光度	0.20	0.18	0.18	0.16	0.18

以上の結果よりフェノール酒精混液の存在下においては、アルカリ性におけるチアミンの分解がある程度阻止されて、その結果分解が遅れる事およびある温度である pH でチアミンの分解はある割合を有する事がわかる。アルカリ性チアミンの分解をフェノール酒精が防止するのは恐らくフェノールと酒精が NaOH とある種の結合例えばフェノレートの様な結合をなす為と考えられる。Melnick³⁾ が回収をよくするためとしてあげた Organic Hydroxy Compound

はすべて両性的なものであるから、この性質はおそらく両性物質に特有なものであろう。

佐藤氏⁹⁾法と藤田氏⁹⁾法とで吸光度係数の少し異なるのは、藤田氏の場合は佐藤氏法よりアルカリ性が極く僅か低いためで、吸着剤からチアミンを溶出するには十分な濃度であるが pH が佐藤氏法に比し低いので、チアミンの分解が阻止されているためであろう。藤田氏はフェノールを NaOH に溶す方法を用いて毎日調整されているが、フェノレートを作る為 NaOH の濃度が一定とならなくなるためであろう。

また藤田氏は酒精の使用をとっていないがこれは酒精溶液中に NaOH 溶液を混合させる為 NaOH の濃度がそれだけ低下して、好結果が得られないので方法として好ましくないからだろうと推定される。

Melnick は酒精、フェノールが存在すれば吸光度がよくなり、また不純物が存在しても回収が非常に良好になる(100%又はそれに近い値を得る)為にこれを使用すると云っているが、これはチアミンの分解がある程度阻止されてジアゾ試薬と反応するのに最も都合のよい状態におかれる為であろうと推定される。

c) フェノール、酒精がこの反応を促進するかすなわち触媒としての作用を有するか否かについて以下の実験を行なった。

イ) フェノール酒精の存在しない場合

可検液 5cc に水 3cc を遠心分離管にとり、これに窒素ガスを 5 分間通ずる。密栓して 30°C の恒温槽につける。別に試験管に 0.5N NaOH 5cc をとり窒素ガスを 5 分通じて恒温槽につける。両液の温度が 30°C になれば合して別に窒素ガス処理をしておいたジアゾ試薬 2cc を加える。恒温槽に第10表のごとき時間つけた後キシロール 5cc を添加常法のごとくして吸光度を検する。

第 10 表

放置時間	5 分	10 分	20 分	30 分	60 分
吸光度	0.14	0.18	0.18	0.18	0.18

ロ) フェノール酒精の存在する場合

イ) の場合において水 3cc を水 2cc とフェノール酒精混液 1cc を加える。他はすべて同条件下において行なわれた。結果を第11表にまとめた。

第 11 表

放置時間	5 分	10 分	20 分	30 分	60 分
吸光度	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23

イ) ロ) とを比較すれば、フェノール酒精の存在する場合もしない場合も最高吸光度に到達する時間に何の差もない事が判る。結局フェノール酒精は触媒でなく単なるチアミンの保護剤であることがわかる。

d) アルカリ性チアミンの温度による変化 (フェノール、酒精の存在下)

b) のロ) と同様の処理を行なった。但し恒温槽の温度は第12表の通りで放置時間は 60 分であった。その結果を第12表にまとめた。

第 12 表

温度	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C
吸光度	0.18	0.18	0.18	0.15	0.10

結局フェノール酒精混液が存在してもアルカリ性チアミンは高温により破かいされる事を知った。

Ⅳ) チアミンの安定剤としての Amphotere Compound

Melnick⁹⁾ は Organic Hydroxy Compound をチアミンの発色を高めるものとして用いた。其の後皆の人もそのために使用している。著者はⅢ) 項において確認した様に Organic Hydroxy Compound は結局チアミンの安定剤として作用するのである。著者はこの作用は Hydroxy Compound の有する両性の性質の為であろうと推測して、無機物はジアゾ試薬と縮合する割合の少い等の利点もあるので、有機物の代りに無機の両性化合物を使用して定量してみた。この代表的物算として酸化アンチモンを使用した。

定量は以下の様にした。遠心分離管に可検液 5 cc と水 3 cc をとる。別に試験管に 0.5N の NaOH 5cc をとり両方とも 30°C の恒温槽につける。温度が 30°C になれば可検液に Sb_2O_3 0.1g を加え軽く振とうして均一にする。すぐ NaOH を加え約 2 秒振とうした後ジアゾ試薬 2 cc を加えて 30°C の恒温槽に 20 分放置後定法のごとくして吸光度を求める。

結果はチアミン 20 γ 以下では吸光度は最高を呈し 20 γ で 0.23 であって、また含量と吸光度はよく比例した。

Ⅴ) アルカリ性チアミンの酸化と分解

チアミンのアルカリ性での破かいは酸化と分解であるが、酸化と分解とはチアミンの塩酸塩が遊離の状態にある時起るのである。塩酸塩は 3 モルの NaOH を添加すればチアゾール核で転位が起り、さらに 1 モルの NaOH が加われば開環する。またチオクロームは 3 モルの NaOH で転位が起った後ピリミジン核の遊離の NH_2 基とチアゾール核の転位した OH との間の縮合により生ずる。

本定量法では存在するチアミンのモル数の 4 倍以上の NaOH を使用する事は明らかである。先にアルカリ性チアミンの安定度において述べた様にフェノール酒精はチアミンを安定に保つ(あるいは分解を阻止する。)これは恐らく NaOH がチアミンの 3 倍量のモル数で反応した後フェノール酒精がチアミンを free の形で保つのではないかと推測される。また分解と酸化はフェノール酒精が存在しない場合は大体同率で行なわれると考えられる。この点を明らかにするために以下のごとき実験を行なった。

a) フェノール酒精の存在しない場合のチアミンの安定性について (チアミン 20 γ 使用)

イ) 窒素ガスを使用しない場合

Ⅲ) b) イ) において述べたごとく処理し、アルカリ性で 10 分放置した。その結果は第 8 表に示してあるごとく 0.03 であって 10 分間に酸化および分解が行なわれ、その結果吸光度が 0.20 (約 87%) 減少したと推測される。

ロ) 窒素ガスを使用した場合

遠心分離管に可検液 5 cc と水 3 cc をとり細管を通じて 5 分間窒素ガスを通す。後密栓して 30°C の恒温槽につける。別に試験管に 0.5N の NaOH 5 cc をとり 5 分間窒素ガス処理をした後これも恒温槽につける。両液の温度が 30°C になればこれを合して軽く混合均一ならしめ 10 分間放置する。後窒素ガス処理をしたジアゾ試薬 2 cc を加えて混合後定法のごとくして吸光度を検する。吸光度は 0.13 である。結局分解のみがおこなわれ吸光度は 0.13 (43.5%) 減少したのである。それで酸化も 43.5% 行なわれた事になり、酸化も分解も同じ割合で行なわれるものと考えられる。

b) フェノール酒精の存在した場合

イ) 窒素ガスを使用した場合

可検液 2 cc を遠心分離管にとり、これに細管を入れて窒素ガスを 5 分通ずる。密栓して 30°C の恒温槽につける。別に試験管に 0.5N NaOH 5 cc を入れて窒素ガス処理を 5 分した後密栓して、恒温槽につける。両液の温度が 30°C になれば合して 10 分放置する。後窒素ガス処理をしたジアゾ試薬 2 cc を加え以下常法のごとくして吸光度を検した。チアミン 20 γ 0.23 を示し 10 分間でチアミンの分解は何もおこらない。

ロ) 窒素ガスを使用しない場合

Ⅲ) b) ロ) と同様に処理する。20 γ のチアミンの吸光度は 0.18 で最高での呈色より 0.05 低い。(混合後 10 分は放置してある。)

フェノールと酒精とが存在したのだから、イ) もロ) も分解は阻止されている筈である。ロ) がイ) に比べて 0.05 低いのは結局 5 分間に酸化が起ったからである。然るに後述する定量法で述べる様にチアミンをアルカリ性にした後激しく攪拌せず、(ジアゾ試薬の分解を防ぐため) すぐジアゾ試薬を加えて放置すると、吸光度は 0.23 となって窒素ガスを使用したこれ迄の方法と比べて何等の差も認められない。これは結局チアミンの遊離の形になったものが酸化される前にジアゾ試薬と反応して終うからであろう。

また イ) において分解が全然起っていないのはフェノール酒精が存在するためにチアゾール核の分解が防がれているためと見るべきである。

以上を論ずれば、フェノール酒精の存在する時此処で問題となるアルカリ性チアミン (すなわち遊離のチアミンであるが) の行なう 3 種の反応の起り方の速度 (free になってすぐ起る反応の速度) は

- 1) デアゾ試薬との結合
- 2) チアミンの酸化
- 3) チアゾール核の開裂

となるのではないかと推測される、それ故攪拌方法が一定しなければ、フェノール酒精が存してチアゾール核の分解をある程度阻止したとしても、空中および溶液中の酸素が問題となって佐藤氏が述べた様に種々の結果を生ずる。

すなわち窒素ガス処理は、佐藤等の述べる様に酸化を防ぐ事も大事な役目であるが、攪拌の様式を一定化するのに大なる役目を演じている。それで攪拌方法を一定にすれば窒素ガスを使用しなくても高く且つ一定した吸光度が得られる。次に遊離型のチアミン (抽出したもの) の定量方法を述べる。

Ⅲ 定 量 法

1) そのまま法

A) 窒素ガスを使用しない場合

1) フェノール酒精法

遠心分離管に可検液 5 cc フェノール酒精混液 1 cc および水 2 cc をとる。別の試験管に 0.5N NaOH 5 cc デアゾ試薬 2 cc を別々にとる。可検液および NaOH を恒温槽につけ、30°C にした後、可検液に NaOH を添加すばやく軽く振とうして (2 秒位) 液を均一にした後、ジアゾ試薬を添加して軽く振とう後恒温槽に 20 分放置後キシロール 5 cc を加えてガラス棒を入れて 2 分間振とうして呈色をキシロール層に移行させ後遠心分離によってキシロール層を分離し液槽

に入れ光電比色計で（濾光板 S 53 で液槽 10mm）吸光度を測定する。

$$x = 88 \times E$$

備考 1. キシロール層に移行させた後の操作はすべての定量法で同じである。

2) 酒精法

遠心分離管に可検液 5 cc をとり、95%のアルコール 1 cc 水 2 cc を加える。これを軽く振とう均一にした後 30°C の恒温槽につける。別に 0.5N の NaOH を試験管にとってこれも 30°C にした後一気に可検液に加え、軽く振とう（2 秒）すぐジアゾ試薬 2 cc を加えて全然振とうせず恒温槽内で 20 分 放置、以下 1) と同様に処理して定量する。

$$x = 88 \times E$$

この定量法を設定するため以下の基礎実験を行なった。

1) 最適アルコール量

定量方法と同一の方法で操作しアルコール量を変えて、その最適量を求めた。

第 13 表

酒精量	1	1.5	2	2.5	3	5
吸光度	0.225	0.23	0.23	0.23	0.21	0.21

2) 比例範囲

酒精 2 cc でチアミン 5~200 γ の範囲で測定可能であった。

3) 酸化アンチモン法（無機両性物質法）

遠心分離に可検液 5 cc 水 3 cc をとる。別に試験管に 0.5N の NaOH 5 cc をとり両方とも 30°C の恒温槽につける。温度が 30°C になれば可検液に Sb_2O_3 0.1g を入れ軽く振とうして均一にする。後 NaOH を加え約 2 秒振とうした後ジアゾ試薬 2 cc を加えて 30°C の恒温槽に 20 分 放置後常法の様にして吸光度を求める。

$$x = 88 \times E$$

この方法はチアミン 20 γ 以下で用いられる。

B) 窒素ガスを使用する方法

1) 酒精法

遠心分離管に可検液 5 cc 酒精 1 cc 水 2 cc をとり窒素ガスを 5 分間通じて後密栓して 30°C の恒温槽につける。別の試験管に 0.5N NaOH 5 cc をとり窒素ガスを 5 分通じた後これも恒温槽につける。温度が 30°C になれば NaOH を可検液に加え、次で 2 分窒素ガス処理を行なったジアゾ試薬 2 cc を加え、さらに窒素ガスを 1 分通ずる。後密栓して恒温槽中に放置、20 分後にキシロールを添加以下常法のごとくする。求める量は $x = 77 \times E$

この方法は吸光度が最高を示す。尚この方法は 5~200 γ の範囲で用い得る。

2) 酸化アンチモン法（無機両性物質法）

遠心分離管に可検液 5cc 水 3cc をとり、これに Sb_2O_3 0.1g を添加後窒素ガスを 5 分通ずる。別の試験管に 0.5N NaOH 5 cc をとり、これも窒素ガス処理する。30°C の恒温槽につけ 30°C になった後可検液を軽く振とうして、 Sb_2O_3 を均一に分布させた後 NaOH を加え直ちに窒素ガス処理をしたジアゾ試薬 2 cc を加え以下常法のごとくしてチアミンの含量を求める。

$$x = 77 \times E$$

この方法はチアミン 20 γ 以下で用いる。

II 吸着法

吸着操作は佐藤氏法のごとくする。

1) アルコール法

吸着した硅藻土に水 7 cc アルコール 2 cc を加えて 30°C の恒温槽につける。別に 0.5N の NaOH 10cc を試験管にとりこれも恒温槽につける。両液の温度が 30°C になれば硅藻土の方をよく振とうして均一にした後 (約 2 秒かかる。) すぐジアゾ試薬 2 cc を加える。後恒温槽に 20 分放置以下吸着法の常法の様にして吸光度を求める。10~200 γ の間で用い得る。

求めるチアミンの含量 $x = 100 \times E$

2) 酸化アンチモン法

吸着した硅藻土に水 9 cc を加える。別に試験管に 0.5N NaOH 10cc をとる。両方とも 30°C の恒温槽につけ 30°C にする。30°C になると硅藻土に 0.2g の Sb_2O_3 を添加して振とう均一にする。これにアルカリ液を加えて軽く振とう (約 2 秒) 均一にした後すぐ 4 cc のジアゾ試薬を加えて軽く振とう恒温槽中に 20 分放置後常法の様にして処理して吸光度を求めた。チアミン 5 γ ~20 γ で用いられる。 $x = 88 \times E$

B) 窒素ガスを使用する方法

1) アルコール法

吸着した硅藻土に水 7 cc 酒精 2 cc を加え細管を入れてから窒素ガスを 5 分間通じて十分に混和する。別の試験管に 0.5N NaOH 10cc をとり 5 分間窒素ガス処理をする。両液とも 30°C の恒温槽につけ 30°C になった後硅藻土を振って均一にした後 (約 2 秒) 窒素ガス処理をしたジアゾ試薬 4 cc を添加 30°C の恒温槽に 20 分放置し後吸着法の常法のごとく処理する。10~200 γ のはんいで用いる。 $x = 88 \times E$

2) 酸化アンチモン法

吸着した硅藻土に水 9 cc を加え細管を通じて遠心分離管を通じて遠心分離管中で窒素ガス処理して充分混和する。別に試験管に 0.5N NaOH 10cc をとりこれも窒素ガスを 5 分通す。後で両液とも 30°C の恒温槽につけ 30°C になった時硅藻土を振とうしこれに 0.2g の Sb_2O_3 を加えてさらに振とうし全体を均一にしてから、NaOH を添加攪拌後 (2 秒) 窒素ガス処理をしたジアゾ試薬 4 cc を添加 30°C の恒温槽につけ 20 分後定法の様にして定量する。 $x = 88 \times E$

チアミン 20 γ 以下に用いる。

ま と め

著者は P-アミノアセトフェノンによるチアミンの定量法を検討して試薬相互間の関係や定量に際しての諸条件を確めて、これによって最も高い発色度を示す定量法を確立してこれを報告した。この際最も重要な点は両性物質のアルカリ性でのチアミンの保護作用にあると考えられる。この作用は液体相互間のみならず、固体と液体の間でも見られる。この事実はビタミン類のみならず他の物質でも生体内で至適 pH でなくても安定に保たれている事実とも何等かの関連があるのではないかと考えられる。

尚、窒素ガスを使用しないでもかなり強く一定した発色を呈する定量法を発表したが、今後はクロマトグラフも考えに入れてなお簡便な方法を見出していきたい。

参 考 文 献

- 1) 水野信雄 名古屋女学院短期大学紀要 4, 59 (昭和32年)

- 2) PRĚBULDA, H, J, MOČOLLŌM, Ě, V : J, biol. Chem 127, 495 (1939)
- 3) MELNICK, D. FIELD, H. : J. biol, Chem, 127, 505, 515, 531 (1939)
- 4) 藤田秋治, 松川男児, 東京医事新誌, 第3188号, 1191 (昭和15年)
- 5) 秘井芳人, 稻垣長典, 大森静, 農化, 16, 331 (昭和15年)
- 6) 佐藤正一, 平野保他, 熱農会誌, 13, 267 (昭和11年)
- 7) BARGAR, G, B, 68 (1935) 2287.
- 8) 佐藤正一, 平野保, 熱農会誌, 14, 13 (昭和17年)