

甘藷の栄養価に関する研究 (第2報)

フルオロメーターによる甘藷の
ビタミン B₂ 定量について

山本喜男・富田裕一郎

I. 緒 言

近時ビタミン B₂ の定量法としては、短時間に而も比較的操作简单であり、特異性の高い点より、ルミフラビン蛍光法が最も優れておると考えられるが、本法の骨子は次の3段階より成る。即ち、① 試料より定量的に B₂ を浸出し、② アルカリ光分解してルミフラビンに導き、③ これを chloroform にて抽出してその蛍光を測定する。この最終段階の比蛍光には、近來 fluorometer が漸次使用され、これによる B₂ 定量法に関する文献も多い。^{1)~3)} 殊に動植物組織では一部の例外を除いて一般に B₂ 含有量は極めて僅少であるから、fluorometer によらなければ正確な測定値は期待し得ないとまでいわれておる。そこで筆者等は fluorometer を使用するルミフラビン蛍光法を甘藷の場合に適用するための基礎的条件特に装置の使用可能範囲、浸出及び光分解条件等の検討を八木氏法⁴⁾ に準じて行い満足すべき成果を得たので茲に報告する。

II. 実験の部

A. フルオロメーター

本実験に使用した fluorometer は monochrometer を用いず、島津製 Spectrophotometer type QB-50 の測定電気回路を利用して、これに蛍光度測定装置を設置したもので、その原理は

Fig. 1. An Illustration of the Structure of the Fluorometer.

- A: light source
 B: condenser
 C: reflecting mirror
 D: ultra violet ray pass filter
 E: cuvette
 F: ultra violet ray screening filter
 G: photomultiplier

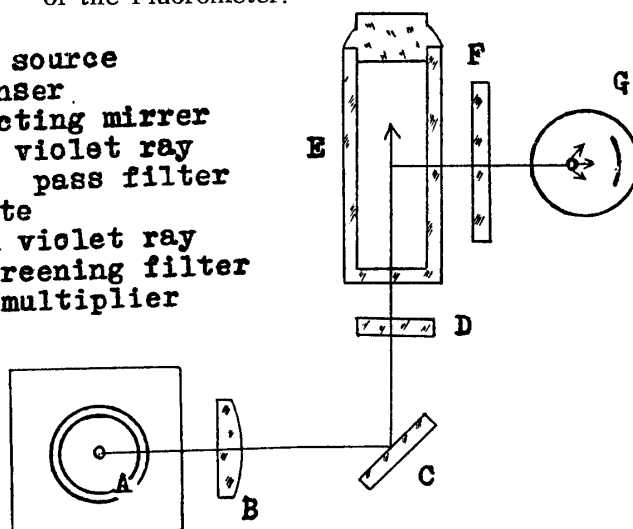


Fig. 1 に示すとおりである。光源は tungsten-lamp でその光は水晶レンズによつて集められ、反射鏡によつて垂直方向に向きを変え、液槽に入る。

液槽の下部には filter があつて約 365 m μ に極大を有する波長幅をもつた紫外線を透過させる。液槽は水晶製で光学的に研磨された底板をもち底から入つた紫外線は試料溶

液にあたって螢光を生ずる。光電管室の前には紫外線遮断フィルターがあつて螢光のみが光電管にあたり光電流を生ずる。これを透過率測定回路に導き測定する。

B. 純ビタミン B₂ 水溶液による検討

本装置の使用可能範囲を予測するため、純ビタミン B₂ 水溶液について濃度とその螢光量との関係を調べて Fig. 2 の結果を得た。これによれば大よ 1.0~1.0×10⁻³ r/cc の範囲内では直線的関係にある。1.0 r/cc 以上になると直線が幾分湾曲するのは紫外線が B₂ に吸収されるために濃度に比して螢光が小となるためであろう。

次に chloroform 中のルミフラビン量とその螢光量が直線をなす範囲を求めるために次の実験を行つた。即ち各種濃度の B₂ 規準液 (0.001~10 r/cc) 2 cc を共栓目盛付遠心沈澱管にとり、N-NaOH 2 cc を加えて混和し、光分解装置 (光源には 200 W 電球を用い分解液中心と電球フィラメントとの距離を 20 cm とした) に置き、20~25° C にて 1 hr. 光分解後氷醋酸 0.2 cc を加えて酸性とし chloroform 6.0 cc で一回抽出し (水冷しながら 2 分間振盪) その 4 cc をとつて螢光を測定した結果は Table 1 及び Fig. 3 の通りである。この結果によれば矢張り B₂ の濃度が 1.0~1.0×10⁻³ r/cc の範囲内で B₂ 濃度とルミフラビ

Fig. 2. The Relation between the Concentration of Riboflavin and its Fluorescence.

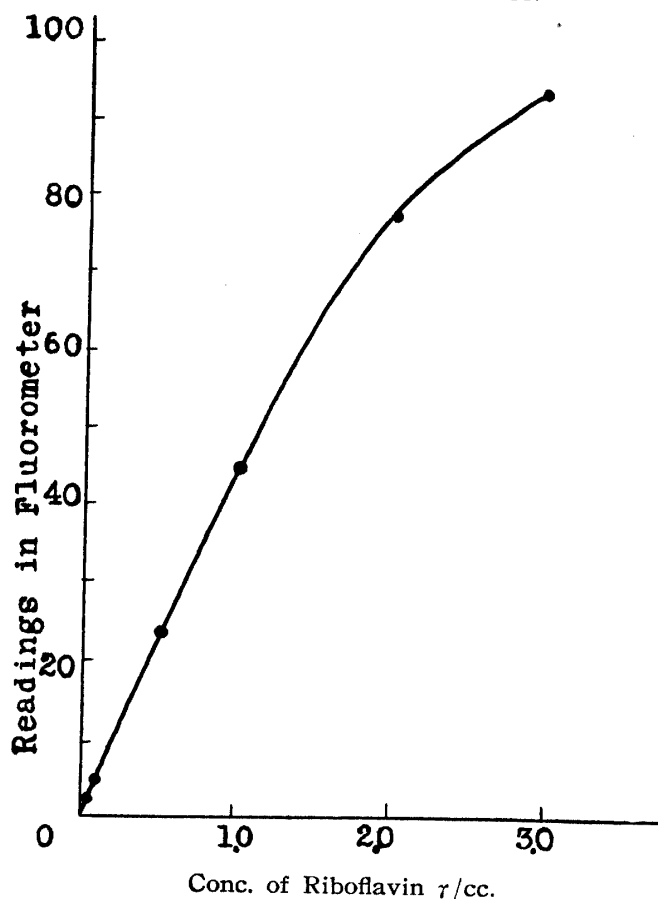


Table 1. The Relation between the Concentration of Lumiflavin and its Fluorescence.

Conc. of Riboflavin (r/cc.)	Readings in Fluorometer		
	100.0	75.0	50.0
0.001	1.0	—	—
0.005	5.0	—	—
0.01	10.0	—	—
0.02	20.0	—	—
0.05	50.0	—	—
0.075	75.0	—	—
0.1	100.0	10.0	—
0.2	—	20.0	—
0.5	—	50.0	—
0.75	—	75.0	—
1.0	—	100.0	10.0
2.0	—	—	18.8
3.0	—	—	27.5
5.0	—	—	38.9
7.5	—	—	54.5
10.0	—	—	68.3

但し、同じ列は感度調節把手の目盛を同一にした時の読みである。

ンの螢光の強さとは正比例する。

以上の検討成績より純ビタミン B₂ 水溶液についてはその濃度が $1.0 \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ r/cc}$ の範囲内においては本装置によつて正確な測定値を期待し得ることを実証したが、これらの実験成績を一般の動植物組織の B₂ 定量にそのままあてはめる訳にはゆかない。何となれば動植物組織中には螢光測定の際に妨害となる不純盲螢光物質⁷⁾や B₂ の光分解を阻止或いは促進する物質^{8) 9) 10)}が存在するからである。

更に又、天然物中の B₂ には three forms¹¹⁾が存在するのでこれを定量的に抽出することが重要な問題である。従つて先ず浸出条件次いで光分解条件を検討する必要がある。

C. 甘藷浸出液による検討

(i) 浸出条件の決定

試料(甘藷根塊を大根卸で磨碎して均一な mash とした)の採取量を変えて 50 cc の水を加え

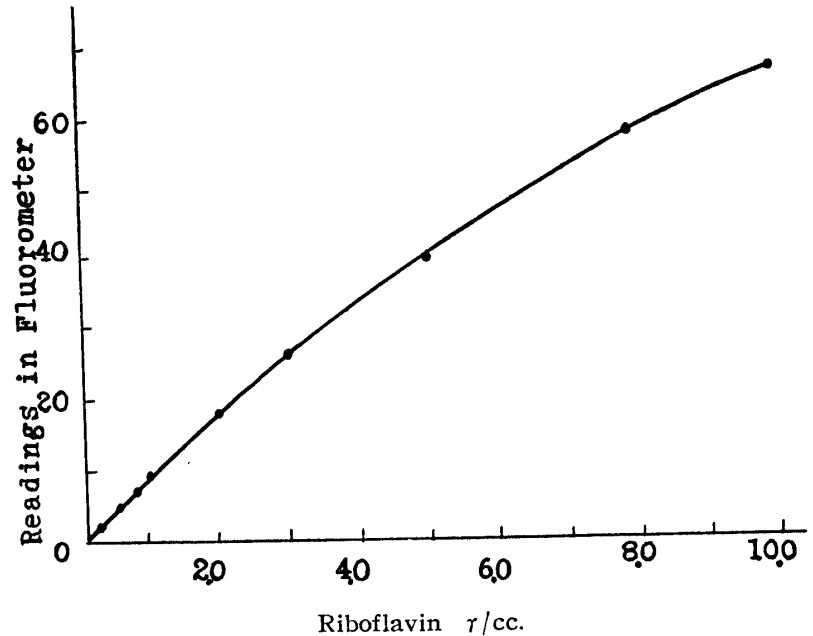
Table 2. Effect of the Volume of the Infusion on the measuring Value of Riboflavin.

Sample (g.)	Volume of Infusion (cc.)	Readings in Fluorometer	Ratio (%)
1.0	50	0.44	100
1.5	50	0.67	100
2.0	50	0.90	102
2.5	50	1.07	97
3.0	50	1.15	87
6.0	50	1.90	71.5
12.0	50	3.28	62

Table 3. Comparison of Result secured by Three Methods of Extraction.

Methods of Extraction	Readings in Fluorometer
(a) Warm Water	1.06
(b) Sulfuric Acid	1.02
(c) Diastase	1.00

Fig. 3. Showing the Relation between the Concentration of Lumiflavin and the Readings in Fluorometer.

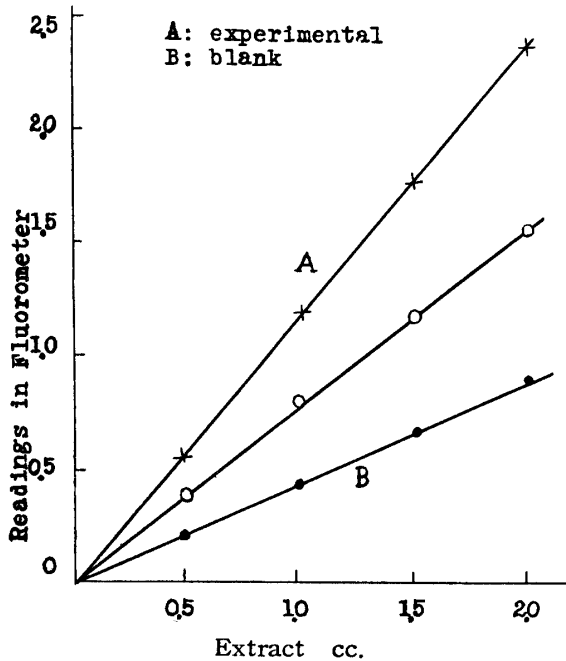


80° C で 15 分間加温浸出し、その 2 cc について光分解後 B₂ 量を測定した。結果は Table 2 に示す如く採取量に比し浸出液量が少なすぎると測定値が低くなる。

換言すれば試料に対して 25 倍容以上の液量を用いた場合に好結果が得られる。

そこで次に浸出方法に基く差異を比較するため温水浸出法,⁶⁾ diastase 法,⁶⁾ 硫酸浸出法⁶⁾ の 3 方法に従つて B₂ 含量を測定したところ Table 3 の如くである。即ち何れ

Fig. 4. The Relation between the Volume of Extract and its Fluorescence.



浸出液 1 cc に既知量の規準 B₂ を添加し前同様に B₂ を測定して Fig. 5 の結果を得た。

これによつても明らかな如く、B₂ の回収率は 100 % にして、蛍光阻害物質の影響は認められない。

(v) 測定例

以上の実験成績より甘藷のビタミン B₂ 定量には八木氏法⁶⁾の温水浸出法が適用し得ることを実証したが、浸出液量は試料に対して 25 倍容を用い、光分解には検液と同容の N-NaOH を加えて 20~25°C にて 40 分間照射 (200 W 電球 20 cm 距離) すれば好結果が得られる。

又、蛍光測定には筆者等の用いた fluorometer にて正確に測定できることは純ビタミン B₂ 水溶液による検討並に甘藷浸出液による実験成績から明らかとなつたので、次に各品種の甘藷について B₂ 含量を測定した結果を Table 7 及び 8 に示した。

Table 7 は植付後 3 ヶ月のまだ生育途上の甘藷について測定した値であり、Table 8 は生育後収穫した甘藷を 6 ヶ月間貯蔵したものにつ

(iii) 試料液量と蛍光との関係

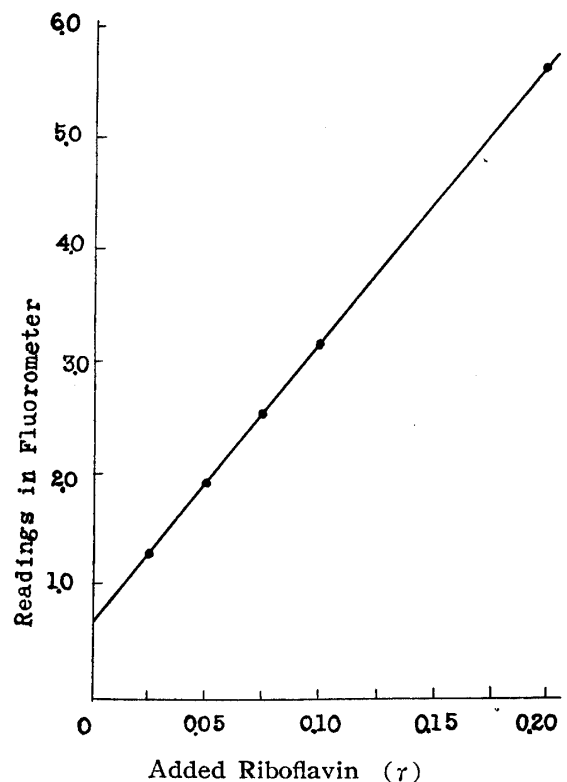
上記の実験では浸出液量はすべて 2 cc としたが、更に少量の検液によつても正確に測定できれば、適用の範囲も拡大され殊に B₂ 含量の僅少な植物組織の場合には好都合と考えられるので次の実験を試みた。浸出液 0.5~2.0 cc に水を加えて全容を 2.0 cc とし、常法通り光分解して B₂ 量を測定した結果は Fig. 4 の如くである。図に示すように明らかに直線的関係が得られ盲蛍光物質による妨害は除去し得ることを示している。

(iv) 添加実験による検討

B₂ 定量の際に問題となるのは前述の盲験値の取り扱いと今一つは回収率の安定性である。

そこで筆者等はこの安定性を調べるために甘藷

Fig. 5. The Relation between Added Riboflavin and its Fluorescence.



いての値であるが、何れも B₂ 含量と品種及び重量との間に一定の関係は認められないようである。

III. 考 察

本実験において、甘藷根塊中の B₂ を抽出するには温水浸出法が好都合であることを明らかにしたが、唯、浸出液量は試料に対して少くとも 25 倍容を用いないと測定値が低く出る。これについて八木氏⁶⁾ は澱粉含量の多い試料では比較的少量の水を用いる必要性を述べており、和田、桜井氏等¹²⁾ は茶の B₂ 定量に際し採取量に対して浸出液が少ないと測定値が小となることを強調して 100 倍容の液量を採用している。

アルカリ光分解については、Table 6 に示したように、純ビタミン B₂ 水溶液と甘藷浸出液とでは、光に対する態度を異にしている。この事実より甘藷浸出液中には B₂ の光分解を遅延せしめる物質が共存することを推論したが、桜井氏¹³⁾ は林檎汁液中にも該物質が存在することを報告し、その

本体は aromatic phenol compounds であることを証明している。従つてこれらの点より考えれば甘藷タンニン、例えば chlorogenic acid の如き物質もその一部の役割を演ずるものであろう。^{14) 15)} しかしながら、その他にも ascorbic acid,⁹⁾ sucrose⁹⁾ etc. が光分解に影響するといわれているので、この点に関しては今後更に研究を進め度い。

Table 7. Riboflavin Contents in the Varieties of Sweet potatoes. (Samples were harvested in three months after planting.)

Varieties	Weights (g.)	Riboflavin Contents (r%)
農林1号	62	31.8
〃〃2〃	53	35.7
〃〃15〃(あぢよし)	50	37.2
〃〃17〃(なかむらさき)	120	19.6
	64	19.2
茨城1〃	56	27.6
	27	15.0
九州14〃	57	34.0
	53	10.3
鹿系3—263	47	11.9
	27	27.0
護 国	28	51.3
	16	43.3
源 氏	59	35.8
隼 人	93	32.4

Table 8. Riboflavin Contents in the Varieties of Sweet Potatoes. (Samples were stored during six months.)

Varieties	Weights (g.)	Riboflavin Contents (r%)
農林1号	220	35.8
〃〃2〃	320	45.8
〃〃7〃	210	48.7
〃〃9〃	215	47.1
九州21〃	175	56.4
鹿系2—186	150	57.6
護 国	155	53.0
蔓無源氏	270	60.8
七 福	240	48.1
隼 人	210	44.0

IV. 要 約

fluorometer によるルミフラビン螢光法を甘藷根塊中の B₂ 定量に適用するため、八木氏法に準

じて基礎的条件例えば装置の使用限界範囲, 浸出及び光分解条件, 回収率等を検討して次の結果を得た.

- (1) 検液中の B_2 濃度が $1.0 \sim 1.0 \times 10^{-3} \text{ } \gamma/\text{cc}$ の範囲内では B_2 濃度と螢光の強さは正比例する.
- (2) 温水浸出法, diastase 法及び硫酸浸出法の相違に基く測定値への影響は認められないが, 浸出液量の影響は大にして試料に対して少くとも 25 倍容の液量を使用しないと測定値が低くなる.
- (3) 光分解の適当な条件は次の如くである. 即ち, (i) NaOH; 検液と同容の N-NaOH. (ii) 温度; $20 \sim 25^\circ \text{C}$. (iii) 照射時間; 40 分.
- (4) 16 品種の甘藷について B_2 含量を測定した結果, 大約 $10 \sim 60 \text{ } \gamma\%$ であつたが, 品種間並に大きさと B_2 含量との間には一定の関係を見出し得なかつた. (1954年8月31日)

本研究を行うに当り試料を恵与せられた鹿児島甘藷試験場に, 又御校閲を賜つた鹿児島大学教授, 西田孝太郎先生に深謝する.

文 献

- 1) A. Z. Hodson & L.C. Norris; J. Biol. Chem., 131, 621 (1939)
- 2) 藤田; ビタミン, 2, 254 (1950)
- 3) 八木; 同上, 6, 528 (1953)
- 4) 加賀谷; 同上, 6, 777 (1953)
- 5) 佐々木, 津郷, 藤巻, 岡; 農化 28, 20 (1954)
- 6) 八木; 最新ビタミン定量法 (1954)
- 7) 八木; ビタミン, 6, 964 (1953)
- 8) 高田, 清水; 同上, 6, 289 (1953)
- 9) 和田, 桜井; 栄養と食糧 5, 44 (1952) : 5, 97 (1952) : 6, 3 (1953)
- 10) 宮崎, 阿部; ビタミン, 6, 657 (1953)
- 11) 八木, 石黒; 同上, 3, 29 (1950)
- 12) 和田, 桜井; 栄養と食糧, 4, 217 (1952)
- 13) 和田, 桜井; 同上, 5, 45 (1952)
- 14) 西田, 山本, 小林, 山元; 醸工, 31, 77 (1953)
- 15) G. O. Rudkin & J. M. Nelson; J. A. C. S., 69, 1470 (1947)

R É S U M É**Studies on the Nutritive Value of Sweet Potatoes****II. A Fluorometric Method for Determining the Riboflavin Content of Sweet Potatoes**

Yoshio YAMAMOTO and Yūichirō TOMITA

The purpose of the present report was primarily to determine the available limits for the fluorometer and the conditions of extraction and photolysis.

The following results were obtained;—

1. The intensity of the fluorescence was proportional to the concentration of riboflavin in the range from 1.0 to 1.0×10^{-3} γ /cc.

2. The measuring value of riboflavin was little influenced by the difference between the three methods of extraction, that is, warm water-, diastase- and sulfuric acid-method, but was much influenced by the volume of the infusion. In this experiment, at least 25 fold volume of liquid for the sample was needed for extraction.

3. The optimum conditions for photolysis were found as below ;

(i) alkalinity and amount of NaOH: the same volume of N-NaOH as the test-solution. (ii) temperature: 20~25° C. (iii) radiation time: 40 minutes.

4. It was shown that the riboflavin content on a number of samples of sweet potatoes varied in the range from 10 to 60 γ % and the interrelation between the riboflavin content, variety and size was not constant.