

螢光法에 의한 Rat 糞尿中の Vitamin B₁ 의 定量

李鉉琪 · 李淑熙

釜山大學校 文理科大學 家政學科

Determination of Thiamine in Urine and Feces of the Rats by the Fluorometric Method

Hyun-Ki Lee · Sook-Hee Rhee

Department of Home Economics, Busan National University

Abstract

Two 3-month old Wistar Strain male rats (weights was 270 g and 340 g respectively) were used as samples in order to determine the daily excretion of thiamine contained in urine and feces by the thiochrome reaction.

The results were as follows.

1. Daily excretion of urine was 5.2 cc per 100 grams of body weight and that of thiamine was 18.65 γ per 100 grams of plasma.
2. Daily excretion of feces was 2.4 grams per 100 grams of body weight and that of thiamine was 7.24 γ per 100 grams of plasma.
3. Daily excretion of thiamine contained in urine is about twice the amount of thiamine excretion contained in feces.

Thus, it can be concluded that more of the excretion of thiamine was mainly excreted through urine.

序 論

Rat의 糞尿中으로 排泄되는 vitamin B₁의 排泄量을 알고져 현재 여러 가지 B₁ 定量法中 그 感度精度, 適用範圍의 여러 경우에 있어서 優秀한 方法인 B₁을 thiochrome 으로 酸化시켜 紫外線下에서 發하는 螢光을 測定하는 美國의 Hennessy¹⁾ (1941년)가 考案한 螢光法으로써 rat 糞尿中の B₁을 定量하였으므로 그 結果를 報告코져 한다.

實驗方法

1. 試料: Wistar 계 흰쥐 숫놈을 이유후 약 3 개

월간 CLEA 고타형 사료로써 사육한 체중 270g 과 340g의 흰쥐를 채뇨 채분장치를 한 cage 에 넣어 3일간 사육하면서 채뇨와 채분을 하였다. CLEA 고타형 사료의 조성은 Table 1 과 같으며 사료 1kg 중의 vitamin 함유량은 Table 2 와 같다.

- 섭취량은 매회 43g 씩 3일간 129g 을 급여하였다. 이 때 잔량은 8g 이며, 섭취량은 121g 이었다.
- 채뇨량은 96cc 이며 채분량은 44g 이었다.

2. 定量方法

a) Thiamine 定量

Thiochrome 螢光法²⁾은 試料를 浸出하여 permutite 의 ion 교환 반응에 의하여 B₁을 흡착시켜

Table 1. Composition of the CLEA Solid Diet (CA-1) %

| | |
|-----------------|------|
| Crude Protein | 25.5 |
| Crude Fat | 4.0 |
| Crude Cellulose | 4.0 |
| Crude ash | 7.0 |
| Ca | 1.0 |
| P | 1.2 |
| K | 0.5 |
| Na | 0.3 |

Table 2. Contents of Vitamin in the CLEA Solid Diet (CA-1) per Kg

| | | | |
|-------------------|-------------|--------------------|----------|
| V. A | 12,000 I.U. | Niacin | 80 mg |
| V. D | 2,400 I.U. | Pantothenic acid | 30 mg |
| V. E | 20 mg | Folic acid | 0.2 mg |
| V. B ₁ | 7 mg | Coline | 1,400 mg |
| V. B ₂ | 10 mg | V. B ₁₂ | 0.02 mg |
| V. B ₆ | 4 mg | V. C | — |

水洗로써 B₁ 以外の 育螢光依雜物을 제거한 후 B₁ 을 溶出하여 알칼리性에서 BrCN²⁾에 의하여 B₁ 을 thiochrome 로 산화시켜 형광을 측정하여 定量하였다.

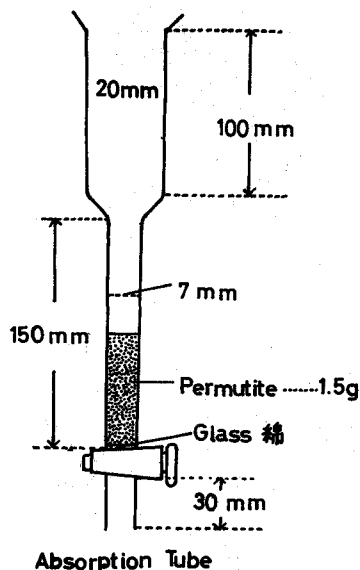
浸出溶液의 調製: 5 cc 의 尿(糞인 경우 5g) 를 측정하여 0.1 N—H₂SO₄ 45 ml 를 加한 후 Water bath 에서 5 분간 잘 混든다.

5 분마다 한번씩 混들어 30 분간 처리 후 50°C 以下로 냉각하여 4 M—CH₃·COONa 3 ml 를 加하여 이것에 5%—多價 diastase²⁾ 6 ml 를 加하여 45~50°C 의 溫浴에 2 hr 두었다(때때로 저어줌). 室溫으로 냉각후 H₂O 를 加하여 100 ml 로 定容하여 7,000 r.p.m. 로서 15 min. 遠沈하여 穢물을 取하여 浸出液으로 하였다.

吸着 및 水洗: 갈색 흡착관(上部內徑 20 mm, 깊이 100 mm, 下部內徑 7 mm, 깊이 150 mm) 에 H₂O 를 加하고 少量의 유리綿을 밑에 깔고 permutite 를 완전히 흡착관에 옮긴 후 cock 를 열어 물을 다 흘러버리고 3%—HAC 10 ml 를 흘러내린 후 물 20 ml 를 1 ml/1 min 의 流速으로 通過시켰다. 여기서 浸出液 10 ml 를 注入하고 역시 위의 流速으로서 B₁ 을 permutite 에 흡착시켰다. 液이 다 흘러내린 뒤 pH 4.5 의 염산 5 ml 로서 흡착관의 上部를

씻었다. 흡착이 끝난 후 沸騰水로서 流速 3~4 ml/1 min 로 하였다 (Fig. 1).

Fig. 1 Absorption and Washing



脫着 및 酸化: 흡착이 끝난 뒤 흡착관이 아직 다 올 때 沸騰 25%—KCl·HCl 액을 加하여 1 ml/1 min 의 流速으로서 通過시킨 液을 탈착액으로서 정확히 25 ml 를 定容하여 sample 로 하였다.

定量方式: Table 3 과 같이 하였다.

Table 3. B₁ Determination

| | Main | Add | Blank |
|----------------------|--------|--------|--------|
| Elute | 5.0 ml | 5.0 ml | 5.0 ml |
| B ₁ -add. | — | 0.5 ml | — |
| HAC—Buffer | 0.5 ml | — | 0.5 ml |
| 30% NaOH | — | — | 2.0 ml |
| BrCN | 3.0 ml | 3.0 ml | 3.0 ml |
| 30% NaOH | 2.0 ml | 2.0 ml | — |

↓
Cubator

↓
Determination

by Electronic photofluorometer

Filter NO: I: 12-221

II: 14-211

共栓遠沈管에서 이같이 操作한 후 穢물의 butanol

층을 5cc, cubater에 取하여 Coleman Instruments, InC. Maywood I.II, 의 Electronic photofluorometer⁴⁾ (Filter No. I : 12~221, II : 14~211 使用) 로 측정하였다.

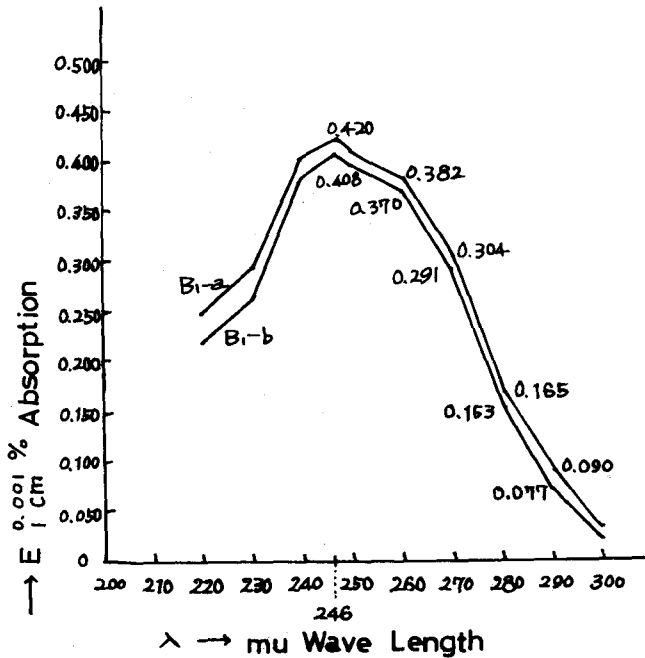
3. 實驗結果

a) B₁의 檢定 : B₁의 結晶 (田辺製 56EC 3397)을 藤原⁵⁻⁶⁾ 渡辺⁸⁾ 등의 방법으로 調製하여 島津光電分光光度計 QV-50形⁷⁾로 測定한 結果를 Table 4와 Fig. 2에 나타낸다.

Table 4. E-Value (220 mμ-300 mμ) of B₁ 10 γ/ml in pH (2-4) by B. P. B(3.8)

| Wave-Length | 220 | 230 | 240 | 246 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| B ₁ -a | 0.250 | 0.295 | 0.400 | 0.420 | 0.410 | 0.382 | 0.304 | 0.165 | 0.090 | 0.036 |
| B ₁ -b | 0.220 | 0.264 | 0.386 | 0.408 | 0.396 | 0.370 | 0.291 | 0.153 | 0.077 | 0.025 |

Fig. 2. E-Value (220mu-300mu) of B₁ 10 γ/ml in PH(2-4) by B. P. B(3.8)

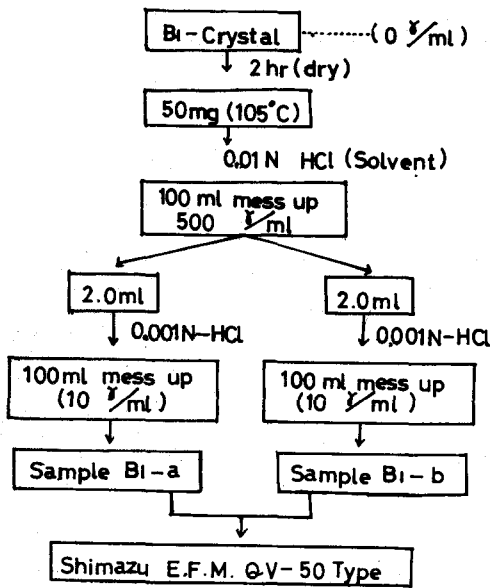


(B₁-a, B₁-b) : B₁ 결정 50mg 을 105℃ 에서 2hr 건조하여 0.001 N-HCl 로서 100ml로 定容, 500 γ/ml로 하여 0.001 N-HCl 로서 10 γ/ml 로 희석하여 a, b 두 개의 檢體를 만들었다 (표준액 조제는 Fig.3 과 같다). B₁은 비교적 잘 檢定되었다.

$$B_1 \text{의 순도 \%} = \frac{E \text{ 1 cm } 246 \text{ m}\mu}{0.421} \times 100$$

B₁의 purity는 98.30이며 factor는 1.0176이었다.

Fig. 3. Sampling of Standard Vitamin B₁ Solution



b) B₁의 檢量曲線: B₁ 결정으로써 만든 표준액을 2.0 γ/ml, 1.5 γ/ml, 1.0 γ/ml, 0.5 γ/ml, 0.1 γ/ml로 1% HAC로서 희석하여 thiochrome 螢光法으로써 측정된 결과를 Table 5와 Fig. 4에 나타낸다.

Fig. 4. Calibration Curve of B₁ Standard Solution

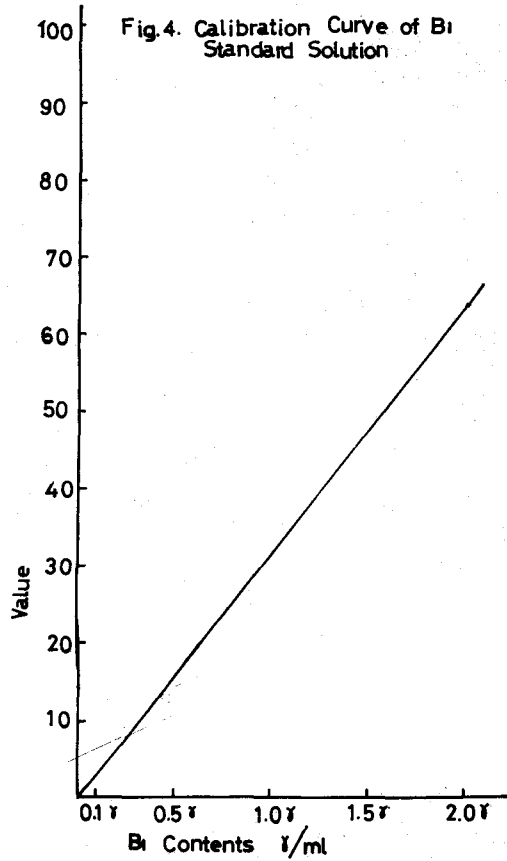


Table 5. Calibration Value of B₁ Standard Solution

| | 1-st | 2-nd | 3-rd | Avg | * |
|----------|------|-------|------|-------|--------|
| 2 γ/ml | 62.0 | 61.4 | 62.2 | 61.87 | ± 0.47 |
| 1.5 γ/ml | 44.5 | — | | | |
| 1.0 γ/ml | 34.0 | 33.25 | 34.6 | 33.95 | ± 0.70 |
| 0.5 γ/ml | 19.5 | | | | |
| 0.1 γ/ml | 4.0 | 3.8 | 4.6 | 4.13 | ± 0.47 |
| Blank | 2.5 | 2.5 | 1.5 | | |

Filter NO

I : 12-221

II : 14-211

* Mean error

c) B₁의 含量: sample 5cc의 尿(糞인 경우 5g)를 100ml로 浸出하여 그 10ml를 흡착시킨 후 25ml로 탈착하여 5ml를 산화시켜 각각 fluorometer로써 측정하였다. 측정된 결과는 Table 6과 Fig. 5에 나타낸다.

Table 6. B₁ Contents in the Feces and Urine (γ/day/100g BW)

| Sample | Time | Blank (f ₀) | Main (f ₁) | Add (f ₂) | Content of sample (γ/g(cc)) | Total daily feces * (γ/1-day/305g) | Daily feces per body W. (g) | Mean error of daily feces body weight (100g) |
|--------|------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| Feces | 1-st | 8.0 | 28.5 | 63.0 | 2.96 | 21.7 | 7.13 | / |
| | 2-nd | 7.5 | 27.5 | 60.0 | 3.07 | 22.5 | 7.37 | |
| | avg | 7.75 | 28.0 | 61.5 | 3.015 | 22.1 | 7.2415 | |
| Urine | 1-st | 4.0 | 26.5 | 57.5 | 3.62 | 57.92 | 19.02 | / |
| | 2-nd | 3.5 | 25.5 | 57.0 | 3.47 | 55.52 | 18.28 | |
| | avg | 3.75 | 26.0 | 57.25 | 3.545 | 51.72 | 18.65 | |

* avg. weight

Calculation

$$M = C \times \frac{f_1 - f_0}{f_2 - f_1} (\mu\text{g})$$

M : Amount of B₁ in the main

C : Amount of B₁ add

f₀ : Blank test

f₁ : Main test

f₂ : Add

$$X = M \times \frac{N \times V}{D \times A} (\mu\text{g/g})$$

X : Amount of B₁ in the sample

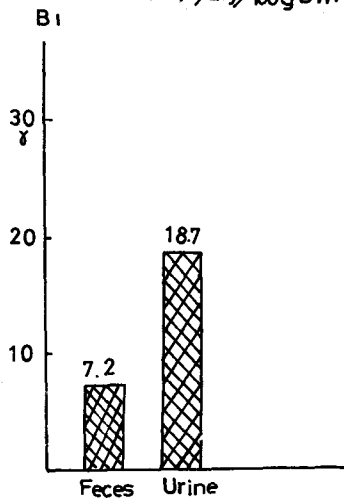
V : Dilution ration

A : Absorption solution

N : Elute

D : Amount of elution (oxidation)

Fig 5. B₁ Contents in the Feces and Urine (γ/day/100g BW)



結 論

생후 3개월이 지난 Wistar 계 흰쥐 숫놈(체중 270g, 340g) 2마리를 치료로 하여 뇨중과 분중의 vitamin B₁의 1일 소비량을 측정코저 thiochrome 산화법에 의하여 형광법으로써 B₁을 정량한 결과는 다음과 같았다.

1) 뇨의 1일 배설량은 체중 100g 당 5.2cc이며

배설되는 vitamin B₁의 양은 체중 100g 당 18.65 γ 였었다.

2) 분의 1일 배설량은 체중 100g 당 2.4g이며 배설된 vitamin B₁의 양은 체중 100g 당 7.24 γ 였었다.

3) 뇨중으로 배설되는 B₁의 1일 소비량은 urine은 feces의 약 2.5 배로 배설됨을 알 수 였었다. 따라서 B₁의 소비는 주로 뇨중으로 많이 소비됨을 알 수 였었다.

References

- 1) Hennessy, D. J.: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 216 (1941)
- 2) 藤原元典: ビタミン 9, 148 (1955)
- 3) Fujiwara, M., Matsui, k.: Anal. Chem. 25, 810 (1953)
- 4) Electronic Photofluorometer (Coleman Institute, InC. Maywood I.II)
- 5) 藤原洋, 中田富義: 武田研究所年報 17, 7 (1958)
- 6) 渡邊厚, 神尾英雄, 藤原洋, 備中住子: 武田研究所年報 13, 56 (1954)
- 7) 藤原洋: 武田研究所年報 17, 13 (1958)